

Priscila Graziela Alves Martins

**BUSCA DE INIBIDORES DA FOSFOTIROSINA FOSFATASE YopH DE
Yersinia enterocolitica E AVALIAÇÃO CITOTOXICOLÓGICA E
ANTITUBERCULAR DE 6 COMPOSTOS PREVIAMENTE DESCRITOS
COMO INIBIDORES DAS TIROSINAS FOSFATASES PtpA e PtpB de
*Mycobacterium tuberculosis***

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Hernán Terenzi
Coorientador: Prof. Dr. Javier Vernal

Florianópolis
Fevereiro de 2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martins, Priscila Graziela Alves

Busca de inibidores da fosfotirosina fosfatase YopH de *Yersinia enterocolitica* e avaliação citotóxicológica e antituberculosa de 6 compostos previamente descritos como inibidores das tirosinas fosfatases PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis* / Priscila Graziela Alves Martins ; orientador, Hernán Terenzi ; coorientador, Javier Vernal. - Florianópolis, SC, 2015.
230 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. inibidores de PTP. 3. *Yersinia* spp. 4. *Mycobacterium tuberculosis*. 5. proteína recombinante. I. Terenzi, Hernán. II. Vernal, Javier. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

"Busca de inibidores da fosfotirosina fosfatase YopH de *Yersinia enterocolitica* e avaliação citotoxicológica e antitubercular de 6 compostos previamente descritos como inibidores das tirosinas fosfatases PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*"

Por

Priscila Graziela Alves Martins

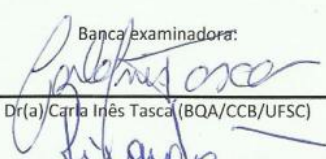
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (005/BQA/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:

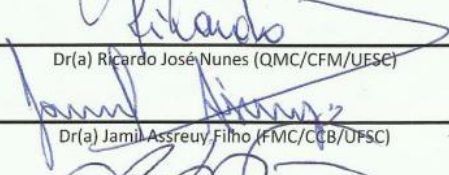


Dr(a) Hernán Francisco Terenzi (BQA/CCB/UFSC)

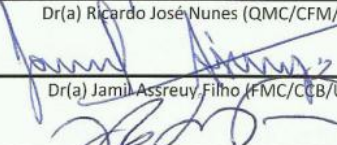
Banca examinadora:




Dr(a) Carla Inês Tasca (BQA/CCB/UFSC)



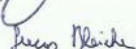
Dr(a) Ricardo José Nunes (QMC/CFM/UFSC)




Dr(a) Jamil Assreuy Filho (FMC/CCB/UFSC)



Dr(a) José Roberto Meyer Fernandes (BQA/UFRJ)



Dr(a) Lucas Bleicher (UFMG)



Prof(a). Dr(a). Carlos Peres Silva
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho à minha família, ao meu namorado, aos meus amigos e àqueles que sempre me apoiaram e torceram por mim não importando a distância.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Hernán Terenzi, por ter proporcionado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, levando desta maneira, a descoberta de minha vocação e paixão pela ciência. Agradeço pelos ensinamentos, apoio, orientação e por disponibilizar todo o material e equipamento necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Alfonso Mendoza-Losana, chefe do Departamento de Microbiologia Molecular da GSK na Espanha, por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse desenvolver parte de minha pesquisa. À Esther por ter ajudado com toda a parte de busca de análogos dos inibidores, pelos conselhos e dicas sobre a interpretação dos resultados, pela ajuda em momentos complicados e pelas viagens turísticas que fizemos. Aos meus dois queridos amigos e “anjos”, Ruben e Pedro primeiramente pela paciência e por ensinarem tudo o que sei sobre cultivo celular e os testes de MIC, citotoxicidade e infecção intracelular. A todas as pessoas maravilhosas que conheci nos laboratórios da GSK: Delia, Noe, Lolo, Flávia, Ane, Maria Jose, Sara, Dani, Maria Gomes, Carol, Maria Martinez pelas “charlas en la cafeteria” e pelos momentos de descontração. Um agradecimento especial a Landys, Eva e Janneth, grandes amigas e companheiras de viagem. Muito obrigada a todos do laboratório da GSK por serem quase uma segunda família, suavizando os momentos de extrema saudade de casa, pelos ensinamentos e amizade. À GSK, em especial a Israel Gloger por dar oportunidade a estudantes de Pós-graduação de conhecerem e trabalharem em uma grande indústria farmacêutica.

Aos meus amigos de outras nacionalidades que conheci na Espanha: Nitin, Matt, Fraser e Diana.

Aos integrantes, amigos e companheiros do CEBIME: Jean, Leonardo, Elis, Natália, Cristiane, Henrique, Douglas, Vanessa, Martina e Elis Rosa. Ao meu grande amigo Tiago pela ajuda nas atividades REUNI (plantões tira-dúvida, feira de ciências no Ribeirão da Ilha, aulas, seminários, relatórios, provas etc).

Um especial agradecimento à Angela e à Alessandra, grandes amigas e companheiras pela ajuda nas purificações das fosfatases, cinéticas e outros ensaios.

À Louise, pela ajuda no planejamento dos experimentos, inúmeras cinéticas, e várias ligações até às 11 horas da noite, pela amizade, momentos de desabafo e conselhos.

Às “CEBIMETES” (Carol, Ange, Deise, Gabi, Ale e Lou), pelos momentos de descontração, discussões sobre o futuro e das vezes que compartilhamos várias calorias com os fondues e pizzas que nos reuníamos para comer.

Às pessoas que sintetizaram ou nos forneceram os compostos para a triagem de novos inibidores da YopH. Um agradecimento em especial à Patrícia do LEAT, por atender prontamente às minhas requisições de mais compostos para fazer os ensaios e por ter sintetizado a grande maioria dos compostos que testei.

Aos meus pais por terem concedido a mim uma educação em nível superior, pelo apoio e por acreditarem no meu potencial. Aos meus irmãos pelos ensinamentos, pelas conversas e pelo apoio. Aos demais familiares por sempre torcerem pelo meu sucesso.

À Ivonete pela ajuda e carinho em vários momentos.

Ao meu companheiro, amigo e amor Gilberto, por ser paciente, pelo carinho e compreensão nos momentos difíceis e por fazer a minha vida mais feliz. Por acreditar e por me fazer acreditar que há um futuro maravilhoso que nos espera e que para alcançá-lo obstáculos deverão ser transpostos.

Aos órgãos financiadores CAPES, CNPq, MCT, FAPESC e FINEP.

À UFSC, universidade que frequento desde a graduação, pelo suporte ao longo destes 9 anos.

“Não me dêem fórmulas certas,
porque eu não espero acertar sempre.
Não me mostre o que esperam de mim,
porque vou seguir meu coração!
Não me façam ser o que eu não sou,
não me convidem a ser igual,
porque sinceramente sou diferente!
Não sei amar pela metade,
não sei viver de mentiras,
não sei voar com os pés no chão.
Sou sempre eu mesma, mas com certeza,
não serei a mesma para sempre”.

Clarice Lispector, jornalista e escritora de renome no Brasil, nascida na Ucrânia 1920-1977.

RESUMO

Proteínas tirosina fosfatases (PTP) têm um importante papel na transdução de sinal e no controle de diversas funções celulares. Bactérias patogênicas como as do gênero *Yersinia* e do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), utilizam suas PTP para subverter as células de defesa do hospedeiro. As bactérias patogênicas do gênero *Yersinia* possuem em comum a produção de uma PTP chamada YopH que modula a resposta inflamatória do hospedeiro à bactéria através de processos que envolvem a inibição da fagocitose, quebra de adesões focais e subversão da função dos linfócitos B e T prevenindo a resposta imune adaptativa. As doenças humanas causadas pelas espécies patogênicas de *Yersinia* variam desde síndromes gastrointestinais à peste bubônica, sendo esta última uma doença grave que ainda não foi erradicada e é associada a milhares de mortes no passado. O Mtb causa a tuberculose, doença que afeta principalmente o trato respiratório. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, a tuberculose foi responsável por 1,5 milhões de mortes somente no ano de 2013. Durante a invasão das células de defesa, o Mtb produz duas PTP, a PtpA e a PtpB. Estas fosfatases, assim como a YopH, tem por função burlar o mecanismo de defesa do hospedeiro. A PtpA é responsável por modular a apoptose celular e impedir a acidificação do fagossomo e a fusão deste com o lisossomo. Já a PtpB, impede a produção de IL-6 e previne a morte do macrófago pela ativação da via de sinalização de Akt e bloqueio da atividade da caspase-3. A busca de inibidores da YopH de *Yersinia* spp. e das fosfatases do Mtb é de grande interesse para a produção de possíveis fármacos que poderiam ser utilizados no tratamento das doenças provocadas por estas bactérias. No presente trabalho, uma biblioteca de 398 compostos foi triada com o objetivo de identificar novos inibidores da YopH. Dentre os inibidores encontrados, 22 apresentaram valores de IC_{50} inferiores a 10 μ M, sendo que 3 estão na faixa de nanomolar (o que os coloca entre os melhores inibidores descritos para esta fosfatase até o momento). Foram encontrados tanto inibidores competitivos (12 compostos) como não competitivos (6 compostos) da YopH e cinco compostos (delfinidina, AAA e os três complexos de vanádio) apresentaram valores de K_i na faixa de nanomolar. Avaliou-se também a citotoxicidade em células THP-1 e HepG2 além da atividade antitubercular de seis inibidores das fosfatases de Mtb (PtpA e PtpB) previamente relatados por nosso laboratório em 2012. Identificou-se dois compostos que não são citotóxicos (compostos 43 e 95) e dois compostos que apresentaram atividade em ensaios de

infecção intracelular (compostos 95 e 96). De acordo com todos os resultados obtidos no presente trabalho, identificamos novas chalconas como eficientes inibidores da YopH além de 3 complexos de vanádio com uma marcante inibição em escala nanomolar. Quanto aos inibidores da PtpA e PtpB, o composto 95 mostrou-se não citotóxico e com atividade nos ensaios de infecção intracelular. Este composto poderia ser utilizado como molde na busca de outros compostos mais ativos ajudando assim no desenvolvimento de novas terapias contra o *Mycobacterium tuberculosis*.

Palavras chave: Proteína tirosina fosfatase, *Yersinia*, *Mycobacterium tuberculosis*, inibidores, antitubercular, YopH, PtpA, PtpB

ABSTRACT

Protein tyrosine phosphatases (PTP) have an important role in signal transduction and in the control of many cell functions. Pathogenic bacteria from *Yersinia* genus and *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) complex, utilize their PTP to subvert host's defense cells. Pathogenic bacteria from *Yersinia* genus have in common the production of a PTP named YopH, this enzyme modules the host inflammatory response against the bacteria through processes that evolves the phagocytosis inhibition, focal adhesion disruption and impairing the function of B and T lymphocytes preventing the adaptive immune response. Diseases caused by pathogenic species of *Yersinia* range from gastrointestinal syndromes to bubonic plague. Bubonic plague is a not eradicated disease that is associated with thousands of deaths in the past. Mtb causes tuberculosis, a disease that affects mainly the respiratory tract. According to World Health Organization data, only in 2013 tuberculosis caused 1.5 million deaths. During the defense cell invasion, Mtb produces two PTP, PtpA and PtpB. These phosphatases act like YopH, they help the bacteria to evade the host defense mechanism. PtpA modulates the cellular apoptosis and it also impairs the phagosome acidification and its fusion with lysosome. PtpB prevents the production of IL-6 and macrophage death by activation Akt signaling pathway and by blocking caspase 3 activity. The search for inhibitors of YopH from *Yersinia* and Mtb phosphatases is of great interest for the production of drugs that could be used in the treatment of the diseases caused by these bacteria. In this work, an in-house library of 398 compounds was screened with the objective to search new YopH inhibitors. Out of the inhibitors found, 22 presented IC₅₀ values below 10 μ M, three of those in nanomolar range (this characteristic put these three compounds between the best described inhibitors for this phosphatase). We found competitive inhibitors (12 compounds) and non-competitive inhibitors (6 compounds) for YopH and five compounds (Delphinidin, AAA and three vanadium complexes) presented K_i values in nanomolar range. Cytotoxicity assays were made with two human cell lines THP-1 and HepG2 we also assayed the antitubercular activity of six inhibitors of Mtb PTP. The inhibitory activity against PtpA and PtpB of these six compounds was previously described in 2012 by our lab. The cytotoxicity and antitubercular assays resulted in two non-cytotoxic compounds (compound 43 and 95) and two compounds that are activity in intracellular infection assays (compounds 95 and 96). In this present work we show new chalcones as efficient inhibitors of YopH, we also

identified 3 vanadium complex with remarkable inhibition in nanomolar scale. According to the results obtained to PtpA and PtpB inhibitors, we identified the compound 95 which is no cytotoxic and has activity in intracell assays. This compound could be used for the design of new compound with improved activity helping in the development of new therapies against *Mycobacterium tuberculosis*.

Keywords: protein tyrosine phosphatase, *Yersinia*, *Mycobacterium tuberculosis*, inhibitors, antitubercular, YopH, PtpA, PtpB

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da PTP1B (1XBO)	32
Figura 2. Mecanismo catalítico das PTP exemplificado pela PTP1B.....	33
Figura 3. Vias de transmissão das espécies patogênicas de <i>Yersinia</i> para humanos.....	36
Figura 4. Distribuição dos casos de peste pelo mundo entre os anos 2000 e 2009.....	38
Figura 5. Diferentes pontos de atuação das Yop liberadas pelas espécies patogênicas de <i>Yersinia</i> no interior da célula do hospedeiro	40
Figura 6. Estrutura da YopH (2I42).....	41
Figura 7. Estimativa da taxa de incidência de TB, 2013.....	44
Figura 8. Estimativa da taxa de mortalidade por TB, excluindo as mortes por TB associadas à co-infecção com HIV, 2013.....	45
Figura 9. Estrutura da PtpA e PtpB, enzimas secretadas pelo Mtb.....	49
Figura 10. Pontos de atuação das PTP secretadas pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50
Figura 11. Representação esquemática da clivagem do substrato <i>p</i> NPP realizada pelas fosfatases.....	60
Figura 12. Estrutura das quatro chalconas com ação inibitória da YopH.....	68
Figura 13. Cinéticas enzimáticas, estrutura das chalconas, valores de K_i e IC_{50}	69
Figura 14. Modelagem molecular dos compostos P4 e P11.....	70
Figura 15 a. Perfis cinéticos das pirazolinas Ea2, Ea3 e Ea6 testadas na fosfatase YopH de <i>Yersinia enterocolitica</i> . Os gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk obtidos para estes compostos condizem com uma inibição não competitiva.....	145
Figura 15 b. Perfis cinéticos das pirazolinas Ea10, Ea16 e Ea24 testadas na fosfatase YopH de <i>Yersinia enterocolitica</i> . Os gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk obtidos para estes compostos condizem com uma inibição não competitiva.....	146
Figura 16. Perfis cinéticos das chalconas PM1, JE02 e JA10. A convergência das retas no eixo y nos gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk obtidos para estes compostos condizem com uma inibição do tipo competitiva.....	149

Figura 17. Perfis cinéticos das chalconas B75, B78 e GSQ159. A convergência das retas no eixo y nos gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk obtidos para estes compostos condizem com uma inibição do tipo competitiva.....	151
Figura 18. Perfis cinéticos dos complexos de vanádio 1, 2 e 3. A análise dos gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk obtidos mostra uma inibição do tipo competitiva.....	153
Figura 19. Perfis cinéticos dos compostos EUFR163, Delfinidina e AAA, representantes dos compostos naturais testados na YopH. A análise dos gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk obtidos mostra uma inibição do tipo competitiva.....	156
Figura 20. Predição da ligação dos complexos de vanádio no sítio catalítico da YopH.....	158
Figura 21. Inibidores competitivos e seletivos da PtpA e PtpB do Mtb. Todos os compostos apresentaram valores de K_i na faixa do micromolar em testes <i>in vitro</i> . Adaptado de CHIARADIA et al., 2012.....	177
Figura 22a. Gráficos obtidos nos ensaios de IC90 com a cepa usada como vacina Mycobacterium bovis BCG e a cepa patogênica Mtb H37Rv. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpA de Mtb.....	179
Figura 22b. Gráficos obtidos nos ensaios de IC90 com a cepa usada como vacina Mycobacterium bovis BCG e a cepa patogênica Mtb H37Rv. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpB de Mtb.....	180
Figura 23a. Gráficos obtidos nos ensaios de citotoxicidade realizados com as linhagens de células humanas HepG2 e THP-1. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpA de Mtb.....	182
Figura 23b. Gráficos obtidos nos ensaios de citotoxicidade realizados com as linhagens de células humanas HepG2 e THP-1. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpB de Mtb.....	183
Figura 24a. Gráficos obtidos no ensaio de infecção da linhagem celular humana THP-1 com BCG-GFP. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpA de Mtb.....	186
Figura 24a. Gráficos obtidos no ensaio de infecção da linhagem celular humana THP-1 com BCG-GFP. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores	

competitivos da PtpB de Mtb.....	187
Figura 25a. Gráficos obtidos no ensaio de infecção da linhagem celular humana THP-1 com BCG-GFP. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpA de Mtb.....	189
Figura 25a. Gráficos obtidos no ensaio de infecção da linhagem celular humana THP-1 com BCG-GFP. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpB de Mtb.....	190
Figura 26a. Comparação entre a porcentagem de células infectadas em macrófagos diferenciados com vitamina D ₃ e macrófagos diferenciados com vitamina D ₃ / ativados com interferon gama em testes de infecção. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpA de Mtb.....	192
Figura 26b. Comparação entre a porcentagem de células infectadas em macrófagos diferenciados com vitamina D ₃ e macrófagos diferenciados com vitamina D ₃ / ativados com interferon gama em testes de infecção. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpB de Mtb.....	193

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Inibidores da proteína tirosina fosfatase YopH com seus respectivos valores de IC ₅₀	67
Tabela 2. Sulfonamidas e sulfoniltiouréias sintéticas com seus respectivos resultados de inibição das enzimas YopH, PtpA e PtpB.....	72
Tabela 3. Chalconas e bis-chalconas sintéticas com seus respectivos resultados de inibição das enzimas YopH, PtpA e PtpB.....	75
Tabela 4. Tetralonas, benzosuberonas e indadonas sintéticas com seus respectivos resultados de inibição das enzimas YopH, PtpA e PtpB.....	88
Tabela 5. Pirazolinas com seus respectivos resultados de inibição das enzimas YopH, PtpA e PtpB.....	91
Tabela 6. Hidrazonas com seus respectivos resultados de inibição das enzimas YopH, PtpA e PtpB.....	94
Tabela 7. Compostos naturais com seus respectivos resultados de inibição das enzimas YopH, PtpA e PtpB.....	98
Tabela 8. Complexos de vanádio, suas estruturas e seus respectivos resultados de inibição das enzimas YopH, PtpA e PtpB.....	106
Tabela 9. Compostos selecionados para prosseguir com os ensaios de IC ₅₀ com suas respectivas porcentagens de inibição da atividade da YopH.....	107
Tabela 10. Resultados obtidos nos ensaios de IC ₅₀ com a enzima YopH.....	109
Tabela 11. Pirazolinas com seus respectivos resultados de IC ₅₀ obtidos para a YopH.....	112
Tabela 12. Estrutura das chalconas precursoras das pirazolinas em estudo.....	115
Tabela 13. Chalconas série AN com seus respectivos resultados de IC ₅₀ obtidos para a YopH.....	118
Tabela 14. Chalconas série KP com seus respectivos resultados de IC ₅₀ obtidos para a YopH.....	119
Tabela 15. Bis-chalconas série BC com seus respectivos resultados de IC ₅₀ obtidos para a YopH.....	120
Tabela 16. Bis-chalconas série PM com seus respectivos resultados de IC ₅₀ obtidos para a YopH.....	122
Tabela 17. Chalconas série JA com seus respectivos resultados de IC ₅₀ obtidos para a YopH.....	123

Tabela 18. Chalconas série JE com seus respectivos resultados de IC ₅₀ obtidos para a YopH.....	124
Tabela 19. Chalconas série N com seus respectivos resultados de IC ₅₀ obtidos para a YopH.....	126
Tabela 20. Chalconas série Py com seus respectivos resultados de IC ₅₀ obtidos para a YopH.....	127
Tabela 21. Chalconas série B com seus respectivos resultados de IC ₅₀ obtidos para a YopH.....	128
Tabela 22. Chalconas heterocíclicas série H com seus respectivos resultados de IC ₅₀ obtidos para a YopH.....	129
Tabela 23. Chalconas heterocíclicas série HB com seus respectivos resultados de IC ₅₀ obtidos para a YopH.....	130
Tabela 24. Benzosuberonas série GSQ com seus respectivos resultados de IC ₅₀ obtidos para a YopH.....	131
Tabela 25. Indanonas série GSQ com seus respectivos resultados de IC ₅₀ obtidos para a YopH.....	132
Tabela 26. Estrutura e valores de IC ₅₀ dos complexos de vanádio e seus ligantes frente à YopH de <i>Yersinia enterocolitica</i>	134
Tabela 27. Valores de IC ₅₀ dos melhores inibidores do grupo 2 em YopH, PtpA, PtpB, PTP1B, LYP e PEST.....	136
Tabela 28. Índice de seletividade (SI) dos melhores inibidores do grupo 2 em PtpA, PtpB, PTP1B, LYP e PEST.....	137
Tabela 29. Valores de IC ₅₀ dos inibidores selecionados no grupo 3 em YopH, PtpA, PtpB, e PTP1B.....	138
Tabela 30. Índice de seletividade (SI) dos melhores inibidores do grupo 3 em PtpA, PtpB e PTP1B.....	139
Tabela 31. Valores de IC ₅₀ para cada fosfatase e seus respectivos índices de seletividade para cada complexo.....	141
Tabela 32. Valores de IC ₅₀ oriundos dos ensaios com as fosfatases YopH, PtpA, PtpB e PTP1B.....	142
Tabela 33. Índices de seletividade dos compostos naturais obtidos para PtpA, PtpB e PTP1B em relação à YopH.....	143
Tabela 34. Parâmetros cinéticos determinados para os melhores inibidores do grupo 1 em YopH.....	147
Tabela 35. Parâmetros cinéticos determinados para os melhores inibidores do grupo 2 em YopH.....	150
Tabela 36. Parâmetros cinéticos determinados para os melhores inibidores do grupo 3 em YopH.....	152
Tabela 37. Parâmetros cinéticos determinados para os melhores inibidores do grupo 4 em YopH.....	154

Tabela 38. Parâmetros cinéticos determinados para os melhores inibidores dos compostos naturais em YopH.....	157
Tabela 39. Alguns inibidores das fosfatases PtpA e PtbB com seus respectivos valores de IC ₅₀	175
Tabela 40. Valores de IC ₉₀ para <i>M. bovis</i> BCG e para Mtb H37Rv das seis chalconas.....	178
Tabela 41. Valores de citotoxicidade de cada um dos seis compostos para as linhagens celulares HepG2 e THP-1.....	184

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Ångström
ATP	Adenosina trifosfato
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
Da	Dalton
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
DSP	Do inglês <i>Dual-specificity phosphatases</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMEM	Meio essencial mínimo Eagle
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GFP	<i>Green Fluorescent protein</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
INF- γ	Interferon gama
IPTG	Isopropil- α -D-tiogalactopiranosideo
K_i	Constante de inibição
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
Loop	Laço
MIC	Concentração inibitória mínima
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Par de base
PBS	Solução de tampão fosfato
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial hidrogeniônico ($-\log [H^+]$)
pI	Ponto isoelétrico
pKa	Constante de acidez
PMA	Forbol 12 miristato 13-acetato
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
pNPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
PTK	do inglês <i>Protein Tyrosine Kinase</i>
PTP	Do inglês <i>Protein Tyrosine Phosphatase</i>
PtpA	Proteína tirosina fosfatase A de <i>M. tuberculosis</i>
PtpB	Proteína tirosina fosfatase B de <i>M. tuberculosis</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>

Tris	Tri(didroximetil)aminometano
K_m	Constante de Michaelis–Menten
YopH	<i>Yersinia outer protein H</i>
Ysc	<i>Yop secretion</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	29
1.1 A fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina, sua importância e seu controle.....	29
1.2 <i>Yersinia</i> spp. e YopH.....	35
1.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , PtpA e PtpB.....	42
2. CAPÍTULO 1 - INIBIÇÃO DA PTP YopH de <i>Yersinia enterocolitica</i>.....	53
2.1 OBJETIVOS.....	53
2.1.1 Objetivo Geral.....	53
2.1.2 Objetivos Específicos	53
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
2.2.1 Preparação de células competentes para transformação.....	55
2.2.2 Transformação das bactérias <i>E.coli</i> BL21(DE3).....	55
2.2.3 Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	56
2.2.3.1 Expressão e purificação das enzimas YopH de <i>Y. enterocolitica</i> e da PTP humana PTP1B	56
2.2.3.2 Expressão e purificação da PtpA e PtpB de Mtb e das enzimas humanas PTP-PEST e LYP.....	58
2.2.4 Triagem e determinação de IC ₅₀ de inibidores da YopH de <i>Y. enterocolitica</i>	59
2.2.5 Estudos de Relação Estrutura e Atividade (REA).....	61
2.2.6 Ensaio de seletividade dos inibidores.....	62
2.2.7 Determinação dos parâmetros cinéticos da YopH.....	63
2.2.8 Modelagem molecular.....	64
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
2.3.1 Inibição enzimática da proteína fosfotirosina fosfatase YopH.....	67
2.3.2 Triagem de novos compostos com capacidade inibitória da atividade catalítica da YopH.....	71
2.3.3 Determinação da IC ₅₀ dos compostos promissores.....	108
2.3.4 Estudos de Relação Estrutura-Atividade (REA).....	111
2.3.4.1 Estudos de REA Grupo 1.....	112
2.3.4.2 Estudos de REA Grupo 2.....	118
2.3.4.3 Estudos de REA Grupo 3.....	128
2.3.4.4 Estudos de REA Grupo 4.....	133
2.3.5 Seletividade dos melhores inibidores frente a outras fosfatases.....	135
2.3.5.1 Seletividade do grupo 2.....	136

2.3.5.2 Seletividade do grupo 3.....	138
2.3.5.3 Seletividade do grupo 4.....	140
2.3.5.4 Seletividade dos compostos naturais.....	142
2.3.6 Determinação dos parâmetros cinéticos e análise do mecanismo de inibição.....	143
2.3.6.1 Parâmetros cinéticos e modo de inibição do Grupo 1.....	144
2.3.6.2 Parâmetros cinéticos e modo de inibição do Grupo 2.....	148
2.3.6.3 Parâmetros cinéticos e modo de inibição do Grupo 3.....	150
2.3.6.4 Parâmetros cinéticos e modo de inibição do Grupo 4.....	152
2.3.6.5 Parâmetros cinéticos e modo de inibição dos compostos naturais.....	154
2.3.7 Modelagem molecular.....	157
2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	161
2.5 PERSPECTIVAS.....	163
3. CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO CITOTOXICOLÓGICA E ANTITU-BERCULAR DE 6 COMPOSTOS PREVIAMENTE DESCRITOS COMO INIBIDORES DAS PTP PtpA e PtpB de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....	165
3.1 OBJETIVOS.....	165
3.1.1 Objetivos Gerais.....	165
3.1.2 Objetivos Específicos.....	165
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	167
3.2.1 Inibidores utilizados nos ensaios de MIC, citotoxicidade e infecção intracelular.....	167
3.2.2 Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	167
3.2.3 Ensaio de citotoxicidade com a linhagem celular humana HepG2.....	168
3.2.4 Ensaio de citotoxicidade com a linhagem celular humana THP-1.....	170
3.2.5 Ensaio intracelular, infecção das células THP-1 com BCG-GFP.....	171
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	175
3.3.1 Determinação da IC ₉₀ dos inibidores seletivos da PtpA e PtpB.....	178
3.3.2 Avaliação da citotoxicidade das seis chalconas.....	181
3.3.3 Avaliação da atividade intracelular das seis chalconas em ensaios de infecção	185
3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	195
3.5 PERSPECTIVAS.....	197
REFERÊNCIAS.....	199
APÊNDICE A.....	225

APÊNDICE B.....	226
APÊNDICE C.....	227
Declaração.....	229

1. INTRODUÇÃO

1.1 A fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina, sua importância e seu controle

A fosforilação reversível de proteínas é um dos principais mecanismos de modificação pós-traducional. Esta modificação é utilizada pelas células no controle de diversos processos básicos tais como divisão, motilidade, metabolismo, expressão gênica, tráfego de organelas e imunidade. Este mecanismo é considerado um processo ubíquo, de alta ocorrência nas vias de transdução de sinais desencadeada por efetores externos como citocinas, hormônios, impulsos nervosos, entre outros (BARFORD et al., 1995; MANNING et al., 2002).

As cinases e as fosfatases são duas grandes famílias de enzimas que controlam o equilíbrio dinâmico do nível de fosforilação das proteínas. As cinases tem por função a transferência do grupo gama-fosfato de um nucleosídeo trifosfato, normalmente o ATP, para os resíduos da proteína substrato. Já as enzimas conhecidas como fosfatases desempenham função oposta às cinases, ou seja, retiram o grupo fosfato (VINTONYAK et al., 2009; BRAUTIGAN, 2013). Segundo Cohen, no genoma humano há aproximadamente 1.000 proteínas cinases e 500 proteínas fosfatases. Este autor também enfatiza que a fosforilação reversível controla quase todos os aspectos da vida celular (COHEN, 2000).

O primeiro relato publicado sobre a atividade de uma cinase ocorreu em 1954 por Geroge Burnett e Eugene P. Kennedy. Estes pesquisadores demonstraram em seu estudo que uma enzima do fígado de rato era capaz de transferir o grupo fosfato do ATP, marcado com fósforo radioativo, para resíduos de serina da proteína caseína (BURNETT e KENNEDY, 1954). Nos anos seguintes, os pesquisadores Fischer e Krebs demonstraram que a interconversão da fosforilase b à fosforilase a no músculo, enzima que participa no metabolismo do glicogênio, envolvia um mecanismo de fosforilação e desfosforilação, propondo assim, pela primeira vez, a fosforilação reversível de proteínas (FISCHER e KREBS, 1955; KREBS e FISCHER, 1956; FISCHER et al., 1959).

Por um tempo acreditou-se que este mecanismo estaria restrito ao metabolismo do glicogênio, porém no final dos anos 60, um estudo publicado por Linn e colaboradores mostrou que o complexo

mitocondrial piruvato desidrogenase, envolvido no metabolismo da glicose, era inativado por fosforilação (LINN et al., 1969). Assim, desde a década de 70 até os dias atuais, houve um considerável aumento no número de publicações sobre a participação da fosforilação no controle de vários processos celulares. No ano de 1992, em reconhecimento à importância de suas descobertas, Krebs e Fischer foram agraciados com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina. Fischer disse em uma publicação recente: *“Ed e eu somos frequentemente questionados se nos dávamos conta no começo que estaríamos lidando com um processo ubíquo e fundamental. Absolutamente não. Nós persistimos neste assunto porque era empolgante e obviamente, um sistema importante a investigar, mas nós nunca poderíamos prever o desdobramento subsequente”* (FISCHER, 2013).

Estima-se que 30% de todas as proteínas celulares tenham uma ligação covalente com o fosfato em pelo menos um resíduo (COHEN, 2000). Em eucariotos essa fosforilação acontece principalmente nos resíduos de serina, treonina e tirosina. Os autores Jeffrey e James, em uma revisão de 2007, citam que em uma célula eucariótica típica há cerca de 10.000 proteínas diferentes contendo em média 400 aminoácidos. Baseados em dados que estimam que 17% destes aminoácidos são treonina, tirosina e serina, estes autores propõem que em uma célula haja a impressionante cifra de quase 700.000 sítios potenciais de fosforilação (UBERSAX e FERRELL JR, 2007).

A adição de um grupo grande e altamente carregado como o fosfato pode causar efeitos marcantes na proteína alvo. O grupo fosforil tem um pKa de aproximadamente 6,7, uma dupla carga negativa e a capacidade de formação de ligação de hidrogênio a partir de seus oxigênios. O grupo fosfato apresenta predominantemente dois tipos de interação. A primeira é servir como um sítio de forte ligação (principalmente com resíduos de arginina) para estabilizar o estado conformacional. A segunda interação é a capacidade do grupo fosforil em interagir com os nitrogênios da cadeia principal no começo de uma α -hélice, utilizando a carga parcialmente positiva de um dipolo da hélice (JOHNSON, 2012). O fosfato adicionado pode, portanto, afetar a proteína substrato de diversas maneiras podendo, por exemplo, interferir em sua atividade, localização, interação com outras proteínas, conformação, função desempenhada, sua estabilidade e seu tempo de meia vida (ZHANG, 2002; MCCONNELL e WADZINSKI, 2009; STÜLKE, 2010; JOHNSON, 2012).

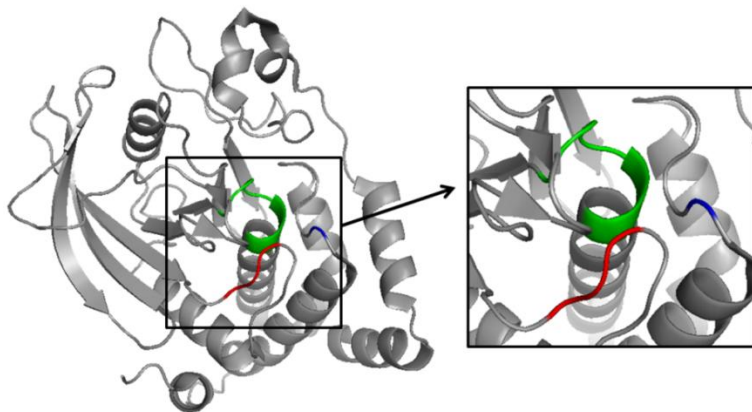
Em humanos a fosforilação ocorre com maior frequência nos resíduos de serina (86,4%) e treonina (11,8%). O baixo índice de

ocorrência no resíduo de tirosina (1,8%) (OLSEN et al., 2006), não significa que a fosforilação neste aminoácido seja menos importante. Controlada por duas grandes famílias de enzimas, as PTK (do inglês *protein tyrosine kinases*) e as PTP (do inglês *protein tyrosine phosphatase*), a fosforilação reversível em tirosina está intimamente ligada a processos fisiológicos como comunicação célula-célula, diferenciação, crescimento e ciclo celular, transcrição gênica, metabolismo e resposta imune (HUNTER, 2000). Estas duas famílias de enzimas são responsáveis por manter o equilíbrio necessário para a manutenção da atividade celular.

O genoma humano codifica 90 PTK (85 cataliticamente ativas) e 107 PTP (11 são inativas, 2 desfosforilam RNAm e 13 desfosforilam fosfolipídios) (ALONSO et al., 2004). Há, portanto, 85 PTK e 81 PTP, o que mostra um equilíbrio na expressão destas enzimas em humanos. A superfamília de PTP pode ser dividida em quatro classes segundo a homologia do domínio catalítico. A classe I engloba as chamadas PTP clássicas, que são enzimas que desfosforilam somente resíduos de fosfotirosina, e as DSP (do inglês *Dual-specificity phosphatases*), que desfosforilam resíduos de fosfotirosina e fosfoserina podendo ainda desfosforilar fosfatidilinositol e mRNA. As PTP clássicas podem ainda ser subdivididas em receptores de membrana e citoplasmáticas. A classe II, onde no genoma humano só há um representante, codifica uma proteína LMW-PTP (do inglês *low molecular weight PTP*). A classe III engloba três homólogos da CDC25 responsáveis em desfosforilar resíduos de tirosina e treonina de cinases dependentes de ciclina (CDK). A última classe, IV, engloba as proteínas Eya que atuam como reguladores transcricionais (HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, 1998; DEN HERTOOG, 2003; NAVIS et al., 2010).

Uma característica marcante dos membros da grande família das PTP é a sequência de aminoácidos (H/V)C(X)₅R(S/T), que forma um ponto de ligação ao fosfato no sítio catalítico, também referenciado como *P-loop*. Nesta sequência encontra-se um resíduo de cisteína que atua como nucleófilo e é essencial para a catálise. Além do *P-loop* outros dois *loops* são necessários para completar a reação de desfosforilação, o *WPD loop* e o *Q loop* (figura 1).

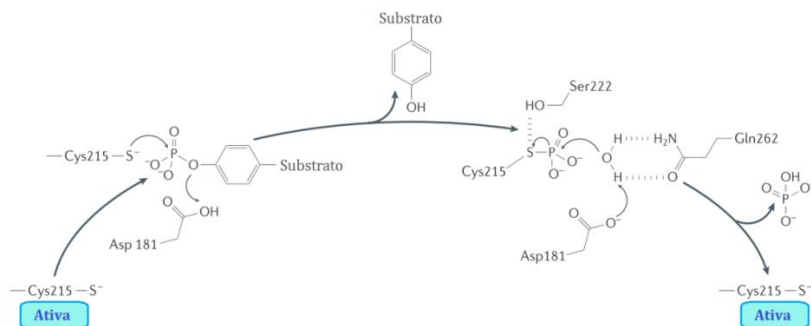
Figura 1. Estrutura da PTP1B (1XBO).



À esquerda, estrutura da PTP1B. À direita, sítio catalítico evidenciado. Em azul o *Q loop*, em vermelho o *WPD loop*, em verde o *P loop*. A figura foi gerada com o programa PyMOL.

O mecanismo catalítico destas enzimas envolve dois ataques nucleofílicos via S_N2 . O ciclo catalítico é mostrado na figura 2, usando como exemplo a catálise realizada pela fosfatase PTP1B humana. O primeiro ataque nucleofílico é realizado pelo átomo de enxofre da cisteína catalítica que ataca o grupo fosfato da proteína substrato. Ao mesmo tempo, o aspartato do *WPD loop* protona a proteína desfosforilada. Em seguida, esta proteína substrato desfosforilada é deslocada e ocorre a formação de um intermediário tio-fosfato que é estabilizado pela arginina presente no *P-loop*. O ciclo catalítico se completa quando ocorre o segundo ataque nucleofílico, que é realizado por uma molécula de água coordenada pela glutamina do *Q loop*. Ao atacar o intermediário, a molécula de água reconstitui a cisteína catalítica oxidada da enzima e ocorre a liberação de um íon fosfato inorgânico. Neste segundo ataque nucleofílico, o aspartato do *WPD loop* atua como receptor de prótons liberado pela água (GUAN e DIXON, 1990; ZHONG et al., 1998; TONKS, 2013).

Figura 2. Mecanismo catalítico das PTP exemplificado pela PTP1B.



A catálise realizada pelas PTP ocorre em duas etapas. Na primeira, o átomo de enxofre da cisteína catalítica (Cys215) ataca o fosfato da proteína substrato ao mesmo tempo em que o grupo de saída tirosil do substrato é protonado pelo ácido aspártico (Asp181). A segunda etapa envolve a hidrólise do intermediário tio-fosfato mediada pelo resíduo de glutamina (Gln262). Este resíduo coordena a molécula de água para o ataque e o Asp181 atua como receptor de prótons da água. Nesta segunda etapa a enzima é reconstituída à sua forma oxidada e há a liberação de um fosfato inorgânico. Adaptado de (TONKS, 2006).

O equilíbrio fosforilação/desfosforilação é de grande importância para a homeostase celular, e não é de se admirar, portanto, que qualquer fator que perturbe este equilíbrio, como por exemplo, o excesso ou decréscimo da atividade das PTP, possa estar relacionado com uma variedade de doenças como câncer (TARTAGLIA et al., 2003), desordens neurodegenerativas (ZHU et al., 2011; BRAITHWAITE et al., 2012) e autoimunes (ZHU et al., 2008; ÅKERMAN et al., 2013). A fosfatase humana PTP1B, por exemplo, está diretamente implicada na sinalização da insulina e leptina. A insulina e a leptina são dois hormônios, o primeiro é produzido pelo pâncreas e o segundo pelos adipócitos, e são responsáveis pela captação da glicose sanguínea e controle da massa corporal, respectivamente.

Estudos em camundongos deficientes da produção da PTP1B demonstraram que estes animais apresentaram baixo acúmulo de gordura corporal e baixo peso devido ao aumento do gasto energético. Além destas características, estes animais são resistentes à obesidade induzida por dieta e apresentaram um aumento da sensibilidade à insulina (ELCHEBLY et al., 1999; KLAMAN et al., 2000). Devido à importância desta enzima na regulação de processos que envolvem gasto

energético e sensibilidade à insulina, há um crescente interesse no desenvolvimento de inibidores para PTP1B quando sua atividade se encontra desregulada em síndromes metabólicas como diabetes (JONNALAGADDA et al., 2014) e obesidade (ITO et al., 2014).

A indústria farmacêutica, juntamente com a área acadêmica, tem pesquisado moléculas com a capacidade de interferir na atividade das cinases e fosfatases. O autor Viktor Vintonyak, em seu artigo publicado em 2011, cita uma conquista na área de tratamento do câncer realizada pela indústria farmacêutica Novartis, a qual teve um composto denominado Imatinib (Gleevec[®]), derivado da pirimidina, aprovado em 2001 para comercialização pelo órgão sanitário dos Estados Unidos *Food and Drug Administration* (FDA) (VINTONYAK et al., 2011). O Imatinib é um inibidor da enzima BCR-Abl cinase derivada de um oncogene mutante associado à leucemia mielóide crônica (NAGAR et al., 2002).

Atualmente já são comercializados inibidores de cinases, sendo a maioria destes medicamentos usados no tratamento de câncer. Porém, ainda não há inibidores de fosfatases aprovados pelo FDA. Alguns compostos inibidores de fosfatases, como por exemplo o Bis(etilmaltolato) oxovanádio(IV) – BEOV, estão em fase clínica IIa de testes em humanos. O BEOV é capaz de reduzir a glicemia de pacientes e melhora as suas respostas à carga oral de glicose quando comparado com os pacientes que receberam somente placebo (THOMPSON et al., 2009). Estudos mostram que a propriedade insulino-mimética dos compostos de vanádio, como o BEOV, pode ser parcialmente explicada pela sua ação inibitória em PTP, entre elas a PTP1B (POSNER et al., 1994; SCIOR et al., 2005; THOMPSON et al., 2009).

Outra área que tem despertado interesse é a inibição de fosfatases produzidas por micro-organismos patogênicos. Algumas bactérias são capazes de interromper/modificar a cascata de sinalização do hospedeiro ao secretar fosfatases no interior das células deste. A bactéria pode então, utilizando este artifício, subverter a resposta imune e colonizá-lo. *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* sorotipo *Typhimurium*, por exemplo, que provoca febre tifóide em ratos, transloca sua SptP, uma PTP, para o interior das células epiteliais, a qual desfosforila uma proteína do hospedeiro (VCP/p97) levando a um aumento da replicação do patógeno nos vacúolos (HUMPHREYS et al., 2009). *Shigella flexneri* pode reprimir a resposta imune inata do hospedeiro através da sua fosfatase de dupla especificidade OspF. Esta enzima desfosforila a histona H3, impedindo assim a acessibilidade do fator de transcrição NF- κ B a uma série de genes, o que poderia levar

consequentemente a um comprometimento do recrutamento de leucócitos polimorfonucleares aos tecidos infectados (ARBIBE et al., 2007).

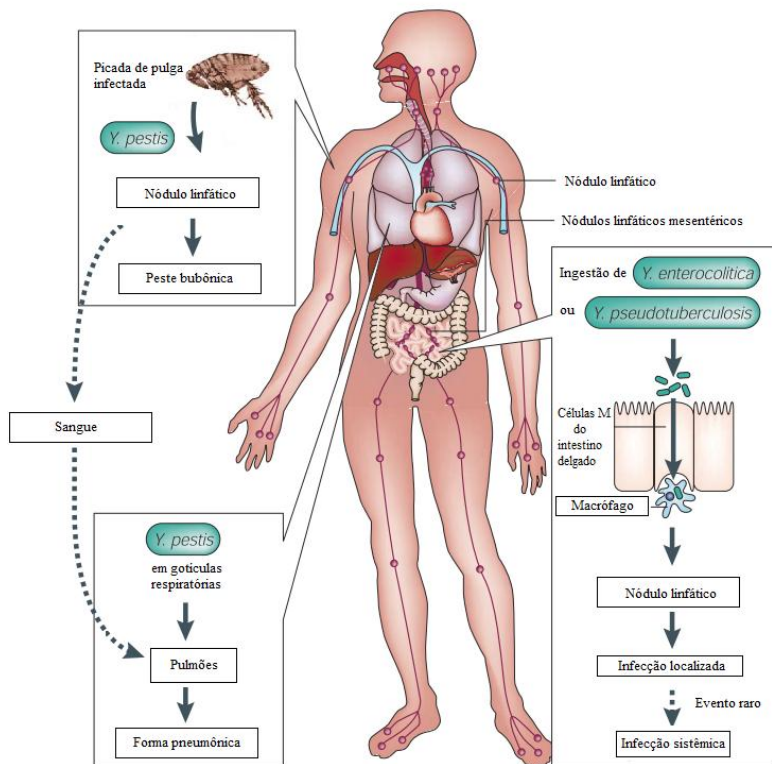
A descoberta da relação das PTPs na patogênese de algumas bactérias é relativamente recente e pesquisas científicas têm sido voltadas para a busca de inibidores destas enzimas, atribuindo assim especial importância a estes alvos terapêuticos emergentes para o tratamento de doenças como a tuberculose, peste, diabetes, entre outras.

Três PTP produzidas por micro-organismos e de grande relevância na patogenicidade destes, recebem destaque no presente trabalho. A YopH, que é produzida pelas bactérias patogênicas do gênero *Yersinia* e as duas PTP produzidas pelo *Mycobacterium tuberculosis*, PtpA e PtpB.

1.2 *Yersinia* spp. e YopH

Os membros do gênero *Yersinia* são bactérias gram-negativas com formato de cocobacilo (BOTTONE, 1999). Onze diferentes espécies pertencem a este gênero, sendo que dentre estas, três são patogênicas ao homem e a outros animais: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* e *Yersinia pestis*. De acordo com as características fenotípicas as cepas de *Y. enterocolitica* podem ser classificadas em seis biogrupos (1A,1B, 2, 3, 4 e 5). A *Y. pseudotuberculosis* apresenta 21 sorogrupos classificados de acordo com o antígeno O. A *Y. pestis* é considerada uma subespécie de *Y. pseudotuberculosis* e evolui desta a partir da transferência lateral e silenciamento de genes. Uma característica particular à *Yersinia pestis* é que esta não apresenta antígeno O (WREN, 2003; VIBOUD e BLISKA, 2005). A figura 3 mostra as vias de transmissão das espécies patogênicas de *Yersinia*.

Figura 3. Vias de transmissão das espécies patogênicas de *Yersinia* para humanos.



A *Y. pestis* é transmitida através de picadas de pulgas infectadas. Esta espécie de *Yersinia* causa a peste bubônica, que eventualmente pode progredir para a peste pneumônica. Neste último caso, a transmissão dá-se por gotículas respiratórias de humano para humano. Nas outras duas espécies, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, a transmissão ocorre por via oral. Estas bactérias penetram através das células M do intestino delgado, atingem os nódulos linfáticos onde podem causar infecção localizada ou, em casos raros, infecção sistêmica. Fonte: (MARTINS, 2010). Adaptado de WREN, 2003. (WREN, 2003).

Y. enterocolitica e *Y. pseudotuberculosis*, conhecidas como Yersinias enteropatogênicas, são normalmente transmitidas por via oral através da ingestão de água e alimentos contaminados. Estas bactérias sobrevivem à ação do suco gástrico e usam como porta de entrada as células M das placas de Peyer do intestino delgado. A infecção

bacteriana normalmente se restringe ao intestino delgado, porção proximal do intestino grosso, placas de Peyer e linfonodos mesentéricos (VIBOUD e BLISKA, 2005). Infecções causadas pela *Y. enterocolitica* levam a síndromes gastrointestinais que variam desde enterite aguda (normalmente em crianças pequenas) à linfadenite mesentérica. Já as infecções ocasionadas pela *Y. pseudotuberculosis* tem como sintomas febre e dor abdominal aguda devida à adenite mesentérica. O paciente pode também apresentar inflamação na porção terminal do íleo e no ceco (BLEVES e CORNELIS, 2000; VIBOUD e BLISKA, 2005).

Normalmente as infecções causadas pelas *Yersinias* enteropatogênicas são auto limitantes mas em raros casos, tanto a *Y. pseudotuberculosis* quanto a *Y. enterocolitica* são capazes de causar sépsis, atingindo vários órgãos e tecidos. O tratamento para as doenças causadas por estas espécies de bactérias envolvem o uso de antibióticos como trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina e cloranfenicol (SMEGO et al., 1999).

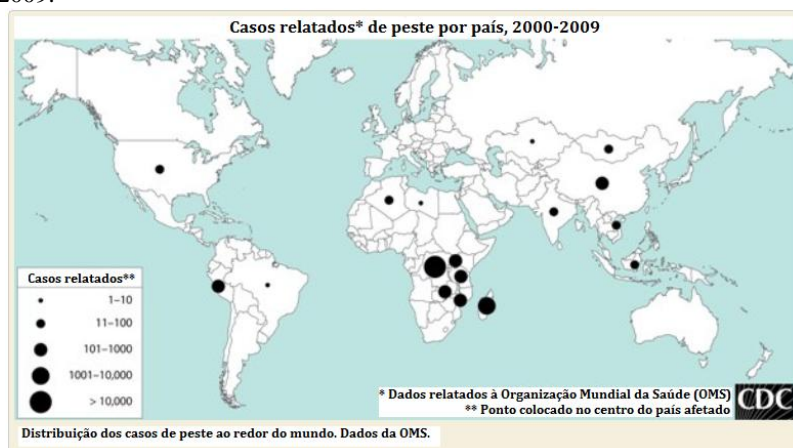
A *Y. pestis* é um dos mais perigosos patógenos existentes e provoca uma infecção bacteriana aguda, a peste. Esta doença é historicamente relacionada a milhares de mortes. Estima-se que entre os séculos XIII e XV a “Peste Negra”, como ficou conhecida a pandemia provocada por esta espécie de bactéria, tenha causado a morte de um terço da população europeia (PERRY e FETHERSTON, 1997). A *Y. pestis* tem um complexo ciclo vital, envolvendo roedores selvagens e suas pulgas, sendo que estas últimas podem transmitir a bactéria a humanos através da inoculação intradérmica do bacilo (WREN, 2003). O período de incubação é de 2 a 6 dias e os sintomas são febre, dor de cabeça, fraqueza, calafrios e inchaço de nódulos linfáticos (bubão) principalmente da virilha, pescoço e axila. Quando atingem a corrente sanguínea, as bactérias podem infectar órgãos como o fígado, baço e pulmão. A morte ocorre em até 50% dos casos sem tratamento. Se os cocobacilos atingirem os pulmões (peste pneumônica), estes poderão ser transmitidos a outros humanos através de gotículas respiratórias. A forma pneumônica é mais letal que a bubônica e a morte normalmente ocorre devido à falência do sistema respiratório, coagulopatia, hemorragia ou em consequência da sépsis (SMEGO et al., 1999; PUTZKER et al., 2001; VIBOUD e BLISKA, 2005; SMILEY, 2008).

A peste pode ser encontrada em países da África, Ásia, América do Norte e do Sul e no sudeste da Europa. Nos Estados Unidos os casos relatados de peste encontram-se mais concentrados na região oeste do país, acometendo principalmente os estados do Novo México, Arizona,

Colorado e Califórnia (CDC, 2013). Na América do Sul a peste foi notificada no Equador, Bolívia, Peru e Brasil (BRASIL, 2008).

No Brasil há duas áreas com focos naturais. A primeira é no Nordeste, acometendo os estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Piauí e Bahia. O segundo foco é entre os limites de Teresópolis, Nova Friburgo e Sumidouro, no Rio de Janeiro. Também foram relatadas zonas pestíferas no vale do Rio Doce e no vale do Jequitinhonha em Minas Gerais (BRASIL, 2008). A figura 4 mostra uma distribuição dos casos de peste no mundo entre os anos 2000 e 2009. Este mapa foi feito pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention* – Estados Unidos) baseado em dados da OMS (Organização Mundial de Saúde).

Figura 4. Distribuição dos casos de peste pelo mundo entre os anos 2000 e 2009.



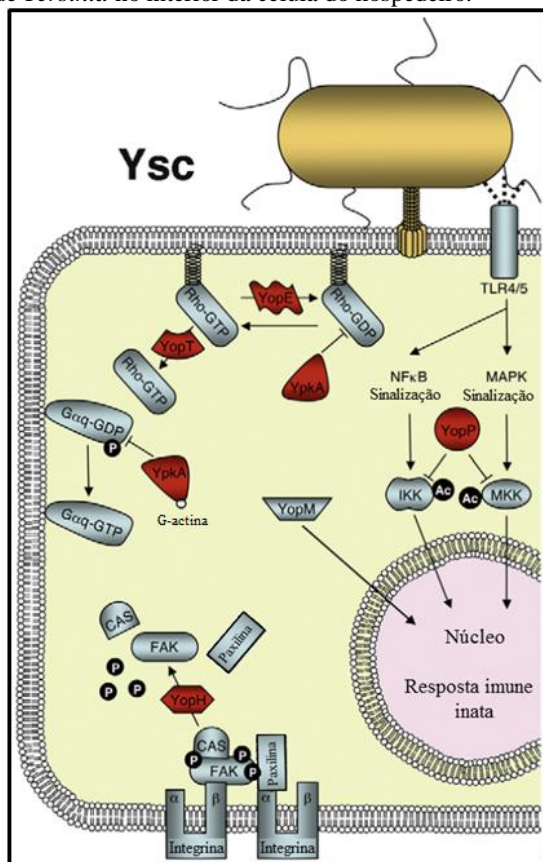
Fonte: Adaptado de (CDC, 2013).

O tratamento para a peste é feito com o antibiótico estreptomicina. A gentamicina também pode ser utilizada, assim como o cloranfenicol e a tetraciclina (BOULANGER et al., 2004; KOIRALA, 2006). Porém nas últimas décadas houve um aparecimento de cepas de *Yersinia pestis* resistentes a antibióticos como penicilina, cloranfenicol e tetraciclina (HU et al., 2013).

Há uma crescente preocupação que uma nova epidemia de peste bubônica possa assolar o mundo. Em julho de 2014 foi relatado um caso de um homem de 38 anos que faleceu de peste bubônica no noroeste da China, na cidade de Yumen. A morte desta pessoa levou vários bairros da cidade de 100 mil habitantes a serem colocados em quarentena (GLOBO, 2014). Há ainda a apreensão de que bactérias desta espécie possam ser utilizadas em armas biológicas, a exemplo do que foi feito com o *Bacillus anthracis* em 2001 nos Estados Unidos (BEIERLEIN e ANDERSON, 2011).

As espécies patogênicas de *Yersinia* possuem características comuns. São patógenos intracelulares facultativos, adaptados a contornar a resposta imune inata, possuem um único cromossomo circular, apresentam tropismo pelo tecido linfático e um plasmídeo circular de aproximadamente 70 kb (CORNELIS e WOLF-WATZ, 1997; WREN, 2003). Este plasmídeo circular contém os genes que codificam proteínas denominadas Ysc, que formam um sistema de secreção do tipo III (também chamado de T3SS), e as Yop (do inglês, *Yersinia outer membrane protein*). O sistema de secreção é responsável pelo deslocamento das proteínas Yop da bactéria para o interior da célula do hospedeiro. As Yop podem ser divididas em dois grupos: o primeiro é responsável por formar um poro na célula do hospedeiro (YopB e YopD), e assim o segundo grupo (YopH, YopE, YopA/O, YopT, YopJ/P, e YopM) é injetado em seu citosol onde efetuam funções diversas inibindo as vias de sinalização da célula do hospedeiro (CORNELIS e WOLF-WATZ, 1997; TRABULSI e MARTINEZ, 2005; VIBOUD e BLISKA, 2005; BLISKA et al., 2013). A figura 5 mostra os diferentes pontos onde as Yop atuam no interior da célula do hospedeiro.

Figura 5. Diferentes pontos de atuação das Yop liberadas pelas espécies patogênicas de *Yersinia* no interior da célula do hospedeiro.

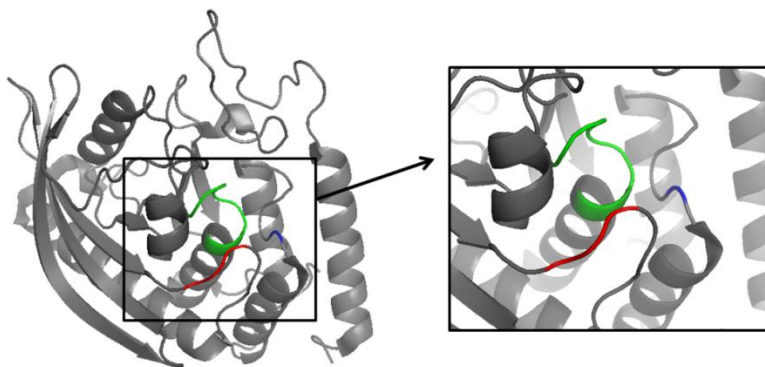


A YopE, YopA e YopT tem como alvo enzimas GTPases da família Rho. A YopKA também fosforila Gαq para prevenir ativação de proteínas G triméricas. A YopH interage desfosforilando proteínas dos complexos focais para inibir a fagocitose. YopP acetila resíduos de serina e treonina em MAPKs e IKKs para prevenir a ativação por fosforilação. A inibição destas vias limita a expressão de genes pró-inflamatórios. A YopM vai até o núcleo onde atrapalha as vias de transcrição gênica. Adaptado de Matsumoto e Young, 2009. (MATSUMOTO e YOUNG, 2009).

Entre as proteínas secretadas por *Yersinia* spp. encontra-se uma PTP com a maior atividade já descrita, a YopH (ZHANG et al., 1992; KE et al., 2012). Esta enzima de 51 kDa possui 468 aminoácidos e dois

domínios: o domínio *N*-terminal, que contém uma região ligadora de chaperona e um domínio de ligação ao substrato (BLACK et al., 1998; KHANDELWAL et al., 2002), e o domínio *C*-terminal (aminoácidos 163 a 468), que possui atividade catalítica (PHAN et al., 2003; WHITTIER e LORIA, 2013). Na YopH o sítio catalítico está entre os resíduos de aminoácidos 403 e 410, onde a cisteína catalítica está na posição 403. Este domínio catalítico é muito similar ao encontrado na fosfatase humana PTP1B e é composto por uma mistura de padrões estruturais de folhas β e α -hélices (WHITTIER e LORIA, 2013). A figura 6 mostra a estrutura da YopH e seu sítio catalítico com os *loops* P, Q e WPD evidenciados.

Figura 6. Estrutura da YopH (2I42).



À esquerda estrutura da YopH. À direita sítio catalítico evidenciado. Em azul o Q *loop*, em vermelho o WPD *loop*, em verde o P *loop*. A figura foi gerada com o programa PyMOL.

Alguns alvos desta enzima já foram identificados. Sabe-se que na ausência de YopH, a invasina localizada na superfície das *Yersinias* enteropatogênicas se liga a um receptor $\beta 1$ integrina presente nas células do hospedeiro. Esta ligação permite a internalização destas bactérias. A YopH quando presente desfosforila proteínas envolvidas na via de sinalização desencadeada pela integrina. Entre estas proteínas estão $p130^{cas}$, FAK e paxilina de células epiteliais e $p130^{cas}$, SKAP-HOM e FYb de macrófagos (BLACK e BLISKA, 1997; PERSSON et al., 1997; BLACK et al., 1998; HAMID et al., 1999; BLACK et al., 2000; DELEUIL et al., 2003). Estas proteínas formam os complexos de adesão focais que tem um papel muito importante na fagocitose mediada por integrina $\beta 1$. A YopH apresenta portanto uma função antifagocítica,

já que a desfosforilação de proteínas do complexo de adesão permite que a bactéria antagonize o seu englobamento por células do hospedeiro (KE et al., 2013). Um estudo recente, feito em modelo animal, demonstrou que a YopH desfosforila as vias de transdução de sinal envolvendo PRAM-1/SKPA-HOM e SLP-76/Vav/PLC γ 2, interrompendo desta maneira a resposta ao cálcio em neutrófilos isolados. O fluxo de cálcio é de grande importância para a produção de interleucina 10 (IL-10) em neutrófilos. Os autores sugerem que a *Y. pseudotuberculosis* se desenvolveria melhor no ambiente quando os níveis de IL-10 produzidos por polimorfonucleares estão diminuídos (ROLÁN et al., 2013).

A atividade catalítica da YopH também leva a um bloqueio do rearranjo do citoesqueleto, diminuindo assim a fagocitose da bactéria pelo macrófago e outras células do sistema imune (GROSDENT et al., 2002). Também pode desativar a via de sinalização PI3K/Akt, interferindo assim na resposta do macrófago à infecção e no recrutamento de outros macrófagos (SAUVONNET et al., 2002). A resposta imune adaptativa também é burlada pela *Yersinia* pela ação da YopH, que tem a capacidade de impedir a ativação dos linfócitos B e T, fato que é crucial para a sobrevivência da bactéria nos nódulos linfáticos do hospedeiro (TONY et al., 1999).

Estudos mostram que a mutação da cisteína catalítica, ou mesmo a deleção do gene codificante para a YopH, reduzem a capacidade do micro-organismo de resistir à fagocitose, atenuando assim a virulência da bactéria e incapacitando-a de colonizar órgãos como fígado e baço (BLISKA et al., 1992; LOGSDON e MECSAS, 2003; TRÜLZSCH et al., 2004).

Devido ao seu papel na patogênese da *Yersinia*, a YopH desponta como um alvo terapêutico promissor na busca de novos fármacos e desenvolvimento de vacinas para as doenças causadas por bactérias deste gênero.

1.3 *Mycobacterium tuberculosis*, PtpA e PtpB

A tuberculose é uma doença considerada um sério problema de Saúde Pública. Foi e ainda é responsável por milhares de mortes ao longo de muitos anos. Faraós, reis, príncipes, marquesas, duques e pessoas sem posse alguma eram acometidos pela doença, não havia distinção entre as classes sociais. O autor José Rosemberg relata em seu

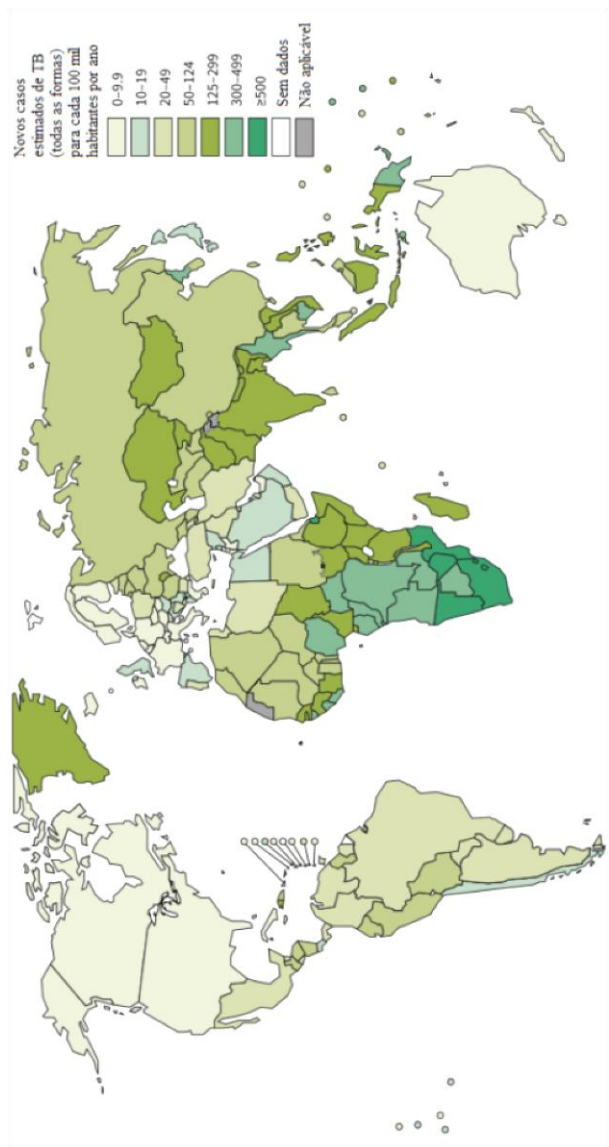
artigo uma série de personalidades que conviveram com a tuberculose, entre elas grandes dramaturgos, poetas e romancistas como Byron, Molière, Franz Kafka, Albert Camus e os brasileiros Castro Alves, Álvares de Azevedo, Casimiro de Abreu, Augusto dos Anjos, Manoel Bandeira, Graciliano Ramos, Cruz e Sousa (ROSEMBERG, 1999). Atualmente a tuberculose é mais associada com a exclusão social, más condições de vida e falta de acesso a serviços e bens públicos (BRASIL, 2014).

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), transmitida por micropartículas contendo os bacilos suspensas no ar. Acomete principalmente os pulmões, podendo também afetar cérebro, baço, olhos, pele, coração, entre outros órgãos (LAWN e ZUMLA, 2011).

O Mtb foi identificado em 1882 por Robert Koch. Esta micobactéria em forma de bacilo é um patógeno intracelular obrigatório, álcool ácido resistente, aeróbio, não encapsulado e não formador de esporos. Contém uma parede celular rica em lipídeos (ácidos micólicos) e apresenta um crescimento muito lento (15-20 h para cada divisão). O Mtb cresce melhor em tecidos ricos em oxigênio, o que explica o fato dos pulmões serem os principais órgãos afetados pela doença (LAWN e ZUMLA, 2011).

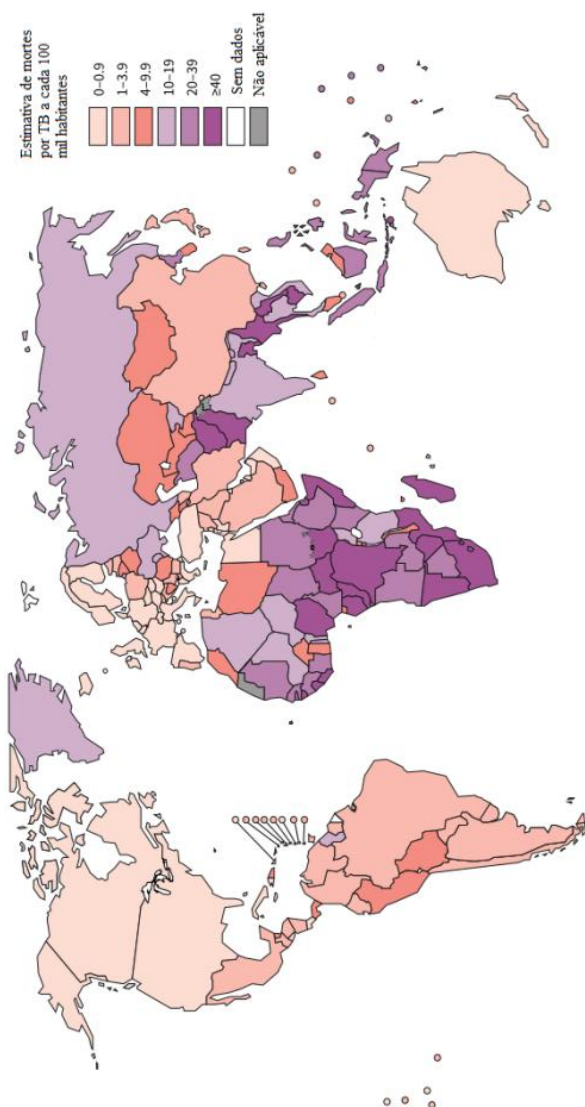
Depois do vírus HIV, a TB é considerada a doença infecciosa que causa mais mortes no mundo. Em 2013 foram estimados 9 milhões de novos casos de TB e 1,5 milhões de mortes devido à doença (1,1 milhões eram pacientes HIV-negativo e 0,4 HIV-positivo). A Ásia e a África concentram a maior parte dos casos relatados, 56% e 29%, respectivamente (WHO, 2014). Quatro de cada cinco casos de TB associado a HIV ocorre na região sub-saariana da África (LAWN e ZUMLA, 2011). Estima-se que um terço da população humana esteja infectada pelo agente etiológico da TB (RUSSELL et al., 2010). Na figura 7 é mostrada a estimativa da taxa de incidência de TB no mundo e na figura 8 é mostrada a estimativa da mortalidade por TB no mundo. Ambos dados foram recentemente publicados pela OMS (WHO, 2014).

Figura 7. Estimativa da taxa de incidência de TB, 2013.



Fonte: Adaptado de (WHO, 2014)

Figura 8. Estimativa da taxa de mortalidade por TB, excluindo as mortes por TB associadas à co-infecção com HIV, 2013.



Fonte: Adaptado de (WHO, 2014)

O Brasil faz parte de um grupo de 22 países que, segundo a OMS, concentram 82% dos casos de tuberculose no mundo, ocupando a 16ª posição em número absoluto de casos. Em 2013 foram diagnosticados 71.123 casos novos de TB no Brasil, uma incidência de 35,4 a cada 100.000 habitantes. É importante ressaltar que houve uma redução significativa da incidência (20,4%) quando comparado ao número de casos relatados em 2003. Dos novos casos relatados em 2013, 85,7% correspondiam à forma clínica pulmonar da tuberculose, destes 65,2% eram bacilíferos, ou seja, estes pacientes eliminavam gotículas respiratórias contendo a carga bacteriana suficiente para transmitir a doença. Segundo dados divulgados em 2012 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o sexo masculino tem uma incidência 2,1 vezes maior de tuberculose do que o sexo feminino. Os dados mostram que a faixa etária masculina mais acometida é a de 40 a 59 anos e a feminina é a de 20 a 39 anos. As capitais brasileiras com maior incidência de TB são Recife, Porto Alegre e Cuiabá (BRASIL, 2014). Os últimos dados revelados pela OMS mostram que no ano de 2012 o Brasil foi um dos 6 países que não conseguiu atingir meta de índice superiores ou iguais a 85% de sucesso no tratamento da doença (WHO, 2014).

A infecção pelo *Mtb* se dá por uma sequência de eventos. Primeiramente, uma pessoa infectada, ao tossir, libera pequenas gotículas contendo os bacilos que podem permanecer na atmosfera por muitas horas. Estes bacilos então, ao serem inalados, atingem os pulmões e são fagocitados pelos macrófagos alveolares. Uma vez fagocitados, os bacilos podem ser destruídos pela ação dos lisossomos ou escapar desta destruição e sobreviver no interior do macrófago, onde se replicarão. Estes macrófagos podem ou permanecer nos pulmões, ou disseminar-se para outros órgãos do corpo (PIETERS, 2008). A fagocitose do bacilo induz uma resposta pró-inflamatória que estimula o recrutamento de células mononucleares para o local. À medida que a micobactéria se reproduz e a resposta imune progride, forma-se o granuloma, ou tubérculo, que consiste de um núcleo de macrófagos infectados rodeados por células do sistema imune, uma camada fibrosa que delimita a periferia da estrutura composta de colágeno e de outros componentes da matriz extracelular. Sob uma resposta imune adequada, o *Mtb* é contido dentro do granuloma onde pode permanecer por muitos anos em estado latente e a pessoa infectada não apresentará os sintomas e não transmitirá a doença. Se algum fator comprometer a imunidade do hospedeiro como, por exemplo, envelhecimento, infecção por HIV, desnutrição, o granuloma poderá colapsar, liberando milhares de bacilos

infecciosos. Esta liberação causará tosse no hospedeiro, e este liberará na atmosfera gotículas contendo os bacilos, reiniciando assim o ciclo (RUSSELL et al., 2010).

Os sintomas da tuberculose são febre, perda de peso, suores noturnos, tosse, dor no peito, insuficiência respiratória e, em estágio avançado, pode causar hemoptise (BLOOM e MURRAY, 1992). Sinais e sintomas em outros órgãos também devem ser considerados, já que a tuberculose não se restringe somente aos pulmões. No Brasil, o diagnóstico da doença é feito principalmente pela baciloscopia do escarro, esta técnica também é utilizada para o controle do tratamento. Uma metodologia implantada no Sistema Único de Saúde (SUS) em 2013 foi o teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB) que tem 90% de sensibilidade e 99% de especificidade. O resultado do TRM-TB é liberado em duas horas, o que favorece o início do tratamento. Outra característica deste teste é a capacidade de detecção da resistência à rifampicina que é um dos principais medicamentos usados contra a doença, diminuindo assim o tempo necessário para iniciar o tratamento com medicamentos de segunda escolha (BRASIL, 2014).

Desde 1921 utiliza-se a vacina BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) como forma de controle da TB, única aprovada para a prevenção da doença, sendo a vacina mais utilizada no mundo. Ela foi desenvolvida através da atenuação de uma cepa de *Mycobacterium bovis* e é usada para proteger principalmente as crianças das formas mais severas da doença. No entanto, seu efeito protetor é ainda controverso (RUSSELL et al., 2010; LAWN e ZUMLA, 2011; ZWERLING et al., 2011).

O tratamento da tuberculose consiste em um longo período de uso (6 meses) de quatro antibióticos de primeira escolha: isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida. O tratamento para as cepas resistentes é mais longo (em torno de 20 meses) e requer fármacos mais caros e tóxicos (com o uso de fármacos como fluorquinolonas, aminoglicosídeos entre outros) (WHO, 2014). Há vários fatores negativos associados ao tratamento atual para TB: duração demasiado longa do tratamento, efeitos adversos dos fármacos utilizados, falta de adesão dos pacientes ao tratamento, co-infecção com HIV e surgimento de cepas multidroga-resistentes (quando apresentam resistência à isoniazida e rifampicina) e extensivo-resistentes (quando também apresentam resistência à fluorquinolonas e a um dos três aminoglicosídeos injetáveis: capreomicina, canamicina ou amicacina) (VAN BOOGAARD et al., 2009).

O grande número de pessoas afetadas pela TB, os fatores negativos associados ao tratamento atual e a ineficiência da BCG em

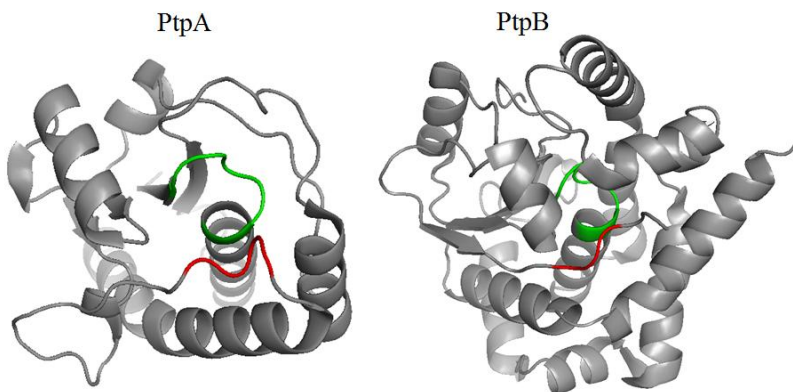
conter uma pandemia, faz com que seja crescente o empenho em produzir novos fármacos e vacinas para esta doença.

Nos últimos anos, duas PTPs secretadas pelo Mtb, PtpA e PtpB, vem despertando o interesse dos cientistas. Estas duas fosfatases possuem sequência de aminoácidos e estrutura distintas de suas homólogas humanas, características estas que as tornam possíveis alvos para novos fármacos contra a TB.

Os genes que codificam a PtpA e a PtpB foram identificados em 1998 por Cole e colaboradores (COLE et al., 1998) e em 2000 as duas enzimas foram clonadas e caracterizadas por Koul e co-autores (KOUL et al., 2000). Estas duas fosfatases, encontradas tanto em lisados de células quanto em filtrados de cultura de Mtb (KOUL et al., 2000), são essenciais para patogênese da micobactéria (SINGH et al., 2003; VERGNE et al., 2005; BACH et al., 2008; BERESFORD et al., 2009; WONG et al., 2011).

A PtpA é uma LMW-PTP de 18 kDa que possui 37% de identidade com a sua ortóloga humana (hLMW-PTPA). O sítio catalítico nesta PTP está entre o C-terminal da primeira folha beta e o N-terminal da primeira α -hélice (SILVA e TABERNERO, 2010). A estrutura da PtpA é mostrada na figura 9 com o sítio catalítico em evidência e o *loop* DPYY que equivale ao WPD das fosfatases clássicas. No caso das LMW-PTP, a molécula de água envolvida no segundo ataque nucleofílico é coordenada pela cisteína adjacente à arginina no sítio catalítico (CIRRI et al., 1993; KOLMODIN e ÅQVIST, 2001), no caso da PtpA Cys16. A presença da Cys16 próxima à cisteína catalítica Cys11 sugere uma possível ponte dissulfeto intramolecular. Esta ponte poderia proteger a cisteína catalítica de uma possível oxidação permitindo que a PtpA reaja rapidamente ao estado redox de seu meio (RAUGEI et al., 2002). No entanto, um estudo realizado por nosso laboratório em 2009 mostrou que esta enzima é nitrosilada *in vitro* ao ser tratada com espécies reativas de nitrogênio. Esta nitrosilação ocorre na Cys53 e leva a uma redução da atividade enzimática (ECCO et al., 2010). O autor Wong sugere então que há possivelmente um outro sistema de proteção à redução que protegeria a PtpA de um possível dano oxidativo (WONG et al., 2013).

Figura 9. Estrutura da PtpA e PtpB, enzimas secretadas pelo Mtb.



À esquerda é apresentada a estrutura da PtpA (1U2Q) e à direita a da PtpB (1YWF). Em ambas enzimas o P-loop está evidenciado em verde. Em vermelho está a sequência de aminoácidos que realiza o papel do WPD *loop* nas PTPs clássicas. O programa PyMOL foi utilizado para gerar estas figuras.

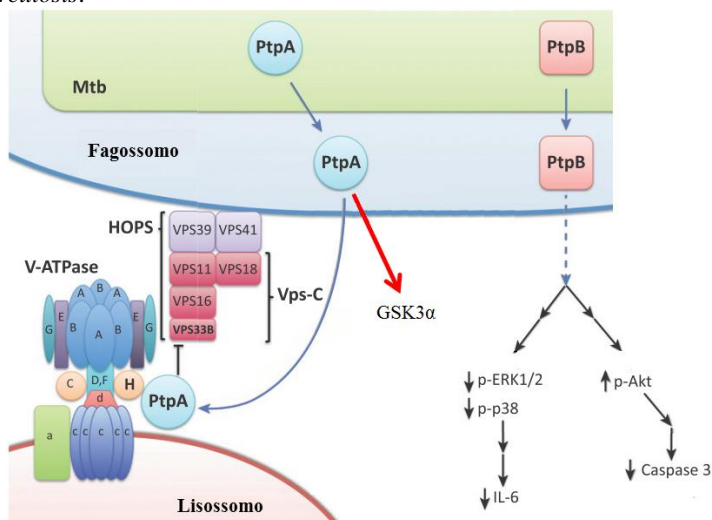
Sabe-se que a PtpA tem como substrato a proteína humana VPS33B, que é membro de um complexo proteico conhecido como Vps-C. Este complexo é um regulador do tráfego e fusão de membranas endossomais. A desfosforilação da VPS33B pela ação enzimática da PtpA leva à inibição da fusão do lisossomo ao fagossomo. O mesmo estudo que elucidou a ação da PtpA sobre a proteína VPS33B também mostrou que a deleção do gene desta fosfatase impede a sobrevivência do Mtb no interior de macrófagos humanos (BACH et al., 2008).

A acidificação do fagossomo é um evento importante na atividade microbida da célula de defesa, não somente pelo fato do pH baixo ser tóxico para muitos micro-organismos, mas também porque muitas enzimas líticas tem sua atividade catalítica ideal em pH ácido. Nos macrófagos esta acidificação ocorre através do recrutamento de uma bomba proteica chamada V-ATPase, que é responsável pelo transporte de prótons através da membrana usando a energia da hidrólise do ATP (HACKAM et al., 1997). Normalmente o complexo V-ATPase interage com o complexo Vps-C e esta interação tem um papel importante na maturação do fagossomo e fusão com lisossomo. Em 2011, foi publicado um estudo que mostra que a PtpA também é capaz de impedir a acidificação do fagossomo. Esta enzima liga-se a subunidade H do complexo V-ATPase, o que resulta em um bloqueio da

interação entre os dois complexos e, além disso, impede o tráfego da V-ATPase para a membrana do fagossomo, inibindo a acidificação deste (WONG et al., 2011).

Um estudo recentemente publicado mostra que a PtpA também é capaz de modular a apoptose ao desfosforilar a proteína GSK3 α nos estágios iniciais da infecção. Essa modulação favoreceria a sobrevivência da célula do hospedeiro (POIRIER et al., 2014). Manter a célula do hospedeiro viva é importante para o Mtb porque a morte desta removeria o meio de crescimento para a bactéria (KEANE et al., 2000). Os sítios de atuação da PtpA são mostrados na figura 10.

Figura 10. Pontos de atuação das PTP secretadas pelo *Mycobacterium tuberculosis*.



A PtpA se liga à subunidade H da V-ATPase vacuolar permitindo a interação com sua proteína substrato VPS33B na interface de fusão do fagossomo e lisossomo. A VPS33B é uma subunidade de um complexo (Vps-C) que regula o tráfego de membrana da via endocítica. A desfosforilação desta proteína resulta na exclusão da V-ATPase do fagossomo. Outro ponto de atuação da PtpA é a proteína GSK3 α que modula a apoptose do macrófago. A atividade da PtpB leva ao decréscimo da fosforilação de ERK1/2 e p38 levando à baixa produção de interleucina 6 (IL-6). Além disso a PtpB leva a ativação da via de sinalização que envolve Akt bloqueando a atividade da caspase 3 o que acarreta o decréscimo da atividade apoptótica. Adaptado de (WONG et al., 2013) e (POIRIER et al., 2014).

A PtpB é uma tirosina fosfatase de 30 kDa de baixa similaridade com fosfatases humanas (SILVA e TABERNERO, 2010). Esta enzima possui tripla especificidade, sendo capaz de desfosforilar fosfoinositídeos, resíduos de fosfotirosina e fosfoserina/treonina (BERESFORD et al., 2007). A figura 9 mostra a estrutura da PtpB.

Ainda não são conhecidos os substratos biológicos da PtpB mas, assim como a PtpA, esta enzima é essencial para a patogênese do Mtb. Em 2003, Singh e colaboradores mostraram que a deleção do gene codificante desta proteína leva à queda da sobrevivência da micobactéria em macrófagos murinos ativados com interferon gama (INF- γ) além de reduzir em 70 vezes a carga micobacteriana no baço de porquinhos-da-índia em comparação com a cepa parental (SINGH et al., 2003). A citocina inflamatória INF- γ é responsável pela atividade antimicrobiana do macrófago contra diversos patógenos, porém, esta citocina não consegue ativar os macrófagos para eliminar o Mtb, o que leva a crer que a micobactéria consegue atuar nas vias de sinalização ativadas pela citocina (ZHOU et al., 2010). Outros estudos também mostraram que o uso de inibidores específicos desta fosfatase promovem a redução da sobrevivência do Mtb no interior de macrófagos (BERESFORD et al., 2009; ZHOU et al., 2010).

Em 2010, Zhou e colaboradores mostraram que a PtpB tem a capacidade de bloquear a produção de IL-6 estimulada por INF- γ devido à regulação *down stream* da atividade da ERK1/2 e da p38. Adicionalmente, a PtpB também previne a morte celular do macrófago, ativando a via de sinalização que envolve Akt e bloqueando a atividade da caspase-3. Ao manter o macrófago vivo, o Mtb favorece a sua própria sobrevivência e replicação no interior da célula hospedeira (ZHOU et al., 2010). A figura 10 mostra as vias de sinalização que são influenciadas pela atividade da PtpB.

Como a PtpA e a PtpB são importantes para a sobrevivência do *M. tuberculosis* no interior do macrófago, há um crescente interesse na busca de compostos capazes de inibir a ação destas fosfatases. Assim, novos fármacos poderiam ser formulados visando a inibição destas enzimas.

Os antibióticos contra o Mtb foram descobertos a partir de suas habilidades de matar a micobactéria *in vitro*. Normalmente estes fármacos têm como alvo estruturas da bactéria, como DNA e proteínas, ou mesmo interferindo na síntese da parede celular. Tanto a PtpA quanto a PtpB não são necessárias para o crescimento *in vitro* da bactéria, mas como relatado anteriormente, são essenciais para a viabilidade *in vivo* na célula do hospedeiro. Por serem secretadas,

fármacos contra estas enzimas não precisariam ultrapassar a parede celular da bactéria e poderiam reativar as vias de sinalização afetadas das células de defesa permitindo que estas combatam a micobactéria englobada (WONG et al., 2013).

Para facilitar a leitura e compreensão desta Tese, a partir deste ponto esta foi dividida em dois capítulos. O primeiro aborda os objetivos, metodologia, resultados e discussão referentes à busca de inibidores para a YopH de *Yersinia*. No segundo é relatada toda a parte desenvolvida durante o período sanduíche no laboratório de Doenças Negligenciadas da empresa GSK, Tres Cantos, Espanha. Todas as referências utilizadas e os Apêndices apresentados após o segundo capítulo.

Posterior aos Apêndices se encontra uma declaração de Angela Camila Orbem Menegatti. Nesta declaração ela diz estar ciente de que dados pertencentes a sua tese de doutorado são mostrados no presente trabalho.

2 CAPÍTULO 1 - INIBIÇÃO DA PTP YopH de *Yersinia enterocolitica*

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo Geral

Este capítulo tem como objetivo buscar novos compostos com propriedades inibitórias frente à proteína fosfotirosina fosfatase YopH de *Yersinia enterocolitica*. Inibidores que atuem em faixas micromolares e que também sejam seletivos para esta enzima poderão ser utilizados no desenvolvimento de novos fármacos contra as enfermidades produzidas por bactérias patogênicas do gênero *Yersinia*.

2.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar ensaios de triagem com uma biblioteca de 398 compostos e selecionar aqueles que apresentarem capacidade inibitória da atividade catalítica da YopH.
- Realizar testes de IC₅₀ com os compostos selecionados na fase de triagem.
- Realizar análises de Relação Estrutura-Atividade (REA) dos compostos.
- Realizar ensaios de inibição com outras fosfatases para avaliar a seletividade dos compostos frente à YopH.
- Estipular os parâmetros cinéticos e tipo de inibição dos melhores inibidores encontrados.
- Selecionar compostos para estudos posteriores de modelagem molecular e de termodinâmica.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Preparação de células competentes para transformação

Foi empregada neste trabalho a metodologia descrita por Ausubel e colaboradores para obtenção de células competentes (AUSUBEL et al., 1995). Segundo esta metodologia, a competência das bactérias é obtida por tratamento químico com cálcio, este íon facilita a aceção do DNA plasmidial por alterar a permeabilidade da membrana das bactérias.

Foram semeadas bactérias *Escherichia coli* BL21(DE3) em placas de Petri contendo LB-ágar (extrato de levedura 0,5 %, peptona 1 %, NaCl 1 %, ágar 2 % pH 7,5). Estas placas foram incubadas por um período de 16 horas a 37 °C. Transcorrido o tempo, transferiu-se uma colônia para 50 mL de meio LB (extrato de levedura 0,5 %, peptona 1 %, NaCl 1 % pH 7,5) o qual foi incubado sob agitação a 37 °C até que fosse atingida a densidade óptica de 0,4 no comprimento de onda de 600 nm. Em seguida centrifugou-se a suspensão de células (6000 g por 20 minutos) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi homogeneizado com 25 mL de uma solução gelada (4 °C) de CaCl₂ 0,1 M. A suspensão foi incubada por uma hora em gelo e novamente centrifugada. O sedimento foi então, homogeneizado com 5 mL de uma solução gelada de CaCl₂ 0,1 M contendo 20 % de glicerol, a suspensão foi mantida por 30 minutos em gelo e em seguida foram feitas alíquotas de 150 µL. As alíquotas foram conservadas a -80 °C.

2.2.2 Transformação das bactérias *E. coli* BL21(DE3)

O professor Dr. Tiago A. S. Brandão da Universidade Federal de Minas Gerais forneceu ao nosso laboratório os plasmídeos p7-7Yop51*Δ162 e pET19b-Hs_PTP1B, codificantes da YopH de *Y. enterocolitica* e a PTP humana PTP1B, respectivamente. Os plasmídeos codificantes da PtpA (pET28a-Mt_PtpA) e PtpB (pET28a-Mt_PtpB) de Mtb foram cedidos pelo Dr. Pedro Alzari do Instituto Pasteur de Paris, França. Já os plasmídeos pET28a-LYP e pET28a-PTP_PEST codificantes das PTP humanas LYP e PTP-PEST respectivamente, foram fornecidos pelo Dr. Nuzio Bottini do *Institute for Genetic Medicine* em Los Angeles, Estados Unidos.

No processo de transformação, cerca de 50 ng dos plasmídeos foram adicionados separadamente a uma alíquota de 150 µL de *E. coli* BL21(DE3) competente. Incubou-se as células por 20 minutos a 4 °C. Em seguida realizou-se um choque térmico ao colocar as células por 2 minutos a 42 °C seguidos de 2 minutos a 4 °C. As células foram então homogeneizadas após o acréscimo de 500 µL de meio LB. Incubou-se a suspensão por 1 hora a 37 °C. As bactérias foram semeadas em meio LB ágar suplementado com o antibiótico pertinente a cada plasmídeo (100 µg/mL de ampicilina para os vetores codificantes da YopH e PTP1B; 50 µg/mL de canamicina para os demais vetores).

2.2.3 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

A purificação das proteínas recombinantes foi feita com o cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare). A pureza das frações obtidas após a purificação foi analisada através de eletroforese em géis de poliacrilamida sob condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Os géis foram posteriormente corados com o corante *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

As enzimas foram quantificadas através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) com o uso de soroalbumina bovina como padrão ou através da absorbância em 280 nm na presença de hidrócloro de guanidina 6 M.

Após o processo de purificação, todas as enzimas utilizadas no presente trabalho foram fracionadas e mantidas em freezer -80 °C.

2.2.3.1 Expressão e purificação das enzimas YopH de *Y. enterocolitica* e da PTP humana PTP1B.

Para realizar a expressão e purificação da YopH e da PTP1B utilizou-se os protocolos previamente descritos em Brandão (BRANDÃO et al., 2009) e Chiaradia (CHIARADIA et al., 2012) com pequenas modificações.

A expressão destas enzimas foi iniciada a partir de pré inóculos de 10 mL de meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. A estes meios foi adicionada separadamente, uma colônia bacteriana obtida durante o processo de transformação. Os pré inóculos da YopH e

da PTP1B foram mantidos sob agitação (150 rpm) a 37 °C por um período de 16 horas. Transcorrido este tempo, 5 mL da suspensão bacteriana foram transferidos para uma garrafa de cultivo contendo 250 mL de meio LB suplementado com o antibiótico já citado. As garrafas de cultivo das duas fosfatases foram mantidas sob agitação (150 rpm) a 37 °C até que o valor de 0,8 de densidade óptica a 600 nm fosse atingido. Em seguida foi adicionado ao meio isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para induzir a expressão das proteínas de interesse (0,4 mM de IPTG para a expressão da YopH e 0,6 mM para expressão da PTP1B). Ambos os cultivos foram mantidos sob agitação (150 rpm) a 25 °C por um período de 16 horas. Em seguida os cultivos foram centrifugados 5.000 x g, por 20 min, a 4 °C.

Para purificar a YopH, o sedimento obtido após a centrifugação foi homogeneizado com 3 mL do tampão Y (Acetato de sódio 100 mM pH 5,7; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM e DTT 1 mM) acrescido de um inibidor de proteases (PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila) à concentração final de 40 μ g/mL. As células homogeneizadas foram, então, rompidas no processo de sonicação (7 ciclos de 20 segundos em gelo), em seguida centrifugou-se o conteúdo a 4 °C, por 40 minutos a 16000 g. A purificação da proteína recombinante foi realizada com a fração solúvel obtida após a centrifugação. No processo de purificação foram utilizados os tampões Y e Y⁺ (Acetato de sódio 100 mM pH 5,7; NaCl 500 mM; EDTA 1 mM e DTT 1 mM) e uma coluna de 5 mL HiTrapTM SP HP (Amersham Biosciences). No pH dos tampões utilizados na purificação, a YopH apresenta carga positiva e é atraída pelo ligante sulfopropil presente na coluna (trocadora de cátions). As demais proteínas solúveis, produzidas pelas bactérias, interagem fracamente com a coluna e são eluídas com a passagem do tampão. A YopH é aos poucos eluída à medida que se realiza um gradiente linear de cloreto de sódio. Após a purificação a enzima foi concentrada por ultrafiltração utilizando um filtro de poro 10 kDa (Amicon Ultra-15 Millipore) e seu tampão foi trocado para Bist-Tris-Propano 20mM pH 6,5; NaCl 10 mM; DTT 1 mM e EDTA 1 mM também por ultrafiltração.

Para purificar a PTP1B, o sedimento obtido após a centrifugação foi homogeneizado com 3 mL do tampão A_PTP1B (Imidazol 20 mM pH 7,5; EDTA 1 mM, DTT 3 mM e glicerol 10%). Utilizou-se durante o processo o inibidor de proteases PMSF à concentração final de 40 μ g/mL. Para a obtenção da fração solúvel, as células foram rompidas por sonicação (7 ciclos de 20 segundos em gelo) e centrifugadas a 4 °C, por 40 minutos a 16000 g. Na purificação desta

enzima foram utilizados dois sistemas ÄKTA (GE Healthcare) e 3 colunas na seguinte ordem: HiTrap™ Q HP de 1 mL (coluna trocadora de ânion da Amersham Biosciences), HiPrep™ 26/10 de 53 mL (coluna desalinizadora e trocadora de tampão) e HiTrap™ SP HP de 1 mL (coluna trocadora de cátion da Amersham Biosciences). A eluição na primeira coluna foi feita com o tampão utilizado para homogeneizar o sedimento e o tampão A+_PTP1B que possui os mesmos componentes que o primeiro e 500 mM de NaCl. A fração correspondente à enzima recolhida da primeira coluna foi eluída na segunda coluna com o tampão B_PTP1B (Bis-Tris 20mM pH 6,5; EDTA 1 mM, DTT 3 mM e glicerol 10%). Os tampões B_PTP1B e B+_PTP1B (Bis-Tris 20mM pH 6,5; NaCl 500 mM; EDTA 1 mM, DTT 3 mM e glicerol 10%) foram utilizados na última coluna para eluir as frações recolhidas na segunda coluna. A PTP1B purificada foi concentrada também por ultrafiltração.

2.2.3.2 Expressão e purificação da PtpA e PtpB de Mtb e das enzimas humanas PTP-PEST e LYP.

Para expressar as enzimas PtpA, PtpB, PTP-PEST e LYP foram feitos pré inóculos de 10 mL de meio LB suplementado com 50 µg/mL de canamicina. A estes meios foi adicionada separadamente, uma colônia bacteriana obtida durante o processo de transformação. Os pré inóculos destas enzimas foram mantidos sob agitação (150 rpm) a 37 °C por um período de 16 horas. Após a primeira etapa de incubação, 5 mL da suspensão bacteriana foram transferidos para uma garrafa de cultivo contendo 250 mL de meio LB suplementado com 50 µg/mL de canamicina. As garrafas de cultivo das quatro enzimas foram mantidas sob agitação (150 rpm) a 37 °C até que o valor de OD₆₀₀ fosse atingido. Em seguida, as garrafas de cultivo das quatro enzimas foram incubadas por 20 minutos na temperatura ideal para a expressão das enzimas (15 °C para PtpA e PtpB e 25 °C para LYP e PTP-PEST) antes do acréscimo de IPTG à concentração final de 0,5 mM. O cultivo das fosfatases foi mantido na temperatura ideal para a expressão das mesmas por um período de 16 horas sob agitação (150 rpm). Os cultivos foram, então, centrifugados a 5.000 x g, por 20 min, 4 °C. Os sedimentos obtidos após a centrifugação dos cultivos foram homogeneizados com o tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol e 10% glicerol) acrescido de inibidor de protease PMSF (40 µg/mL) e sonicados em gelo. Em seguida, realizou-se a

centrifugação 16.000 x g por 40 minutos, a 4 °C. Separou-se a frações solúveis para proceder com o processo de purificação.

As fosfatases PtpA, PtpB, PTP-PEST e LYP possuem um grupo de seis histidinas em sua parte N-terminal (His-Tag) o qual facilita as suas purificações pela metodologia de cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC- do inglês *Immobilized Metal Affinity Chromatography*). As frações solúveis anteriormente obtidas foram eluídas em colunas HisTrap (colunas contendo níquel como metal imobilizado, Amersham Biosciences) com o uso dos tampões A (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, glicerol 10%) e tampão B (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, glicerol 10%, Imidazol 0,5 mM, 1 β-mercaptoetanol 1 mM). Por possuir uma estrutura química semelhante à histidina, o imidazol contido no tampão B compete pelo níquel presente na coluna com a cauda de histidina das proteínas recombinantes, à medida que a concentração do imidazol aumenta, as proteínas de interesse são eluídas.

As frações correspondentes às proteínas purificadas foram submetidas a diálises sequenciais para a retirada gradual do imidazol. O último tampão utilizado na diálise e no qual as proteínas foram mantidas é o Tris-HCl pH 8,0; NaCl 50 mM, EDTA 5mM; glicerol 20%; DTT 5mM. Logo após, procedeu-se à concentração das proteínas por ultrafiltração.

2.2.4 Triagem e determinação de IC₅₀ de inibidores da YopH de *Y. enterocolitica*

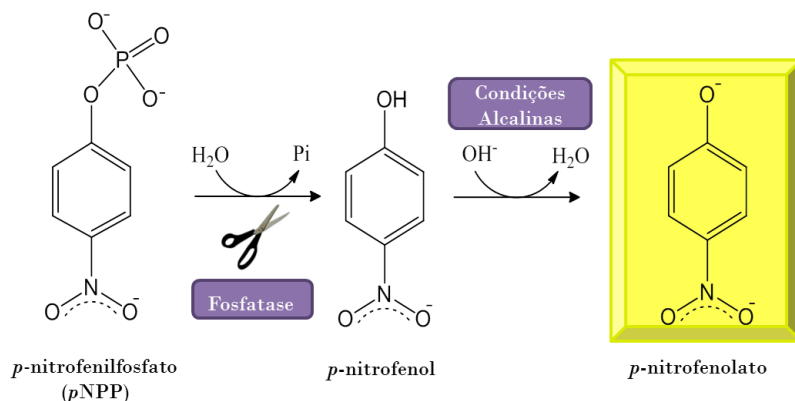
Uma biblioteca de 398 compostos foi avaliada quanto a sua capacidade inibitória da atividade catalítica da YopH. Estes compostos foram provenientes de distintos laboratórios: Laboratório Estrutura e Atividade (LEAT-UFSC), grupo NIQFAR (Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas) da UNIVALI, *Cátedra de Química Inorgânica (Facultad de Química- UDELAR-Uruguai)* e *Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco, Sapienza, Università di Roma*, Itália. Alguns compostos foram cedidos da biblioteca particular do Dr. Paulo César Leal.

O acervo desta biblioteca é composto por moléculas de distintas classes químicas: 31 sulfonamidas, 8 sulfoniltiouréia, 190 chalconas (onde também foram testadas bis-chalconas e chalconas heterocíclicas),

22 indanonas, 21 tetralonas, 10 benzosuberonas, 25 pirazolinas, 46 hidrazonas, 42 compostos naturais e 3 complexos de vanádio.

Os ensaios de triagem, IC_{50} , cinéticos e de seletividade foram feitos em microplacas de 96 poços (TPP®). Realizou-se nestas microplacas reações de 200 μ L de volume final onde foi utilizado o *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) como substrato sintético das fosfatases. A hidrólise do substrato catalisada pelas enzimas (Figura 11) foi acompanhada espectrofotometricamente a 410 nm em leitor de microplaca (TECAN Infinite M200). A determinação das absorbâncias foi feita durante 10 minutos com leituras realizadas a cada minuto. A variação dos valores de absorbância entre os tempos 2 minutos e 5 minutos (respeitando a linearidade do ensaio) foi determinada para a realização dos cálculos.

Figura 11. Representação esquemática da clivagem do substrato pNPP realizada pelas fosfatases.



Fonte: Adaptado de www.bitesizebio.com

Realizou-se a triagem nas seguintes condições: tampão imidazol 20 mM pH 7; o composto a ser avaliado na concentração final de 25 μ M, YopH 13 nM. A enzima foi incubada com o composto por 10 minutos a 37 °C antes do acréscimo do substrato pNPP à concentração final de 20 mM. Os compostos testados foram previamente solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) 100 %. Para excluir uma possível inibição da enzima pelo DMSO, este solvente foi acrescentado no controle enzimático (controle positivo) na concentração final de

2,5 %. Os ensaios de triagem foram feitos em triplicata em três dias distintos.

Determinou-se a porcentagem de inibição pela relação entre a variação de absorbância da enzima na presença de um determinado composto e a variação da absorbância do controle positivo (enzima com 2,5 % de DMSO), considerando este último como 100 % de atividade. Os compostos que apresentaram uma inibição superior a 50 % foram selecionados para prosseguir com os ensaios de IC₅₀. O valor de IC₅₀ corresponde à concentração necessária de inibidor requerida para reduzir a atividade da enzima em 50 % (PATRICK, 2009).

Nos ensaios de IC₅₀, onze diferentes concentrações do inibidor foram testadas enquanto que as concentrações de enzima (13 nM para YopH) e de substrato (20 mM) foram mantidas constantes. Assim como na triagem, os ensaios foram feitos em triplicata em três dias diferentes e os compostos foram incubados por 10 minutos com a enzima antes da adição do substrato. Primeiramente era testada uma faixa de concentração final do composto em análise que variava de 5 a 100 µM. Se posteriormente ao se calcular o valor de IC₅₀, fosse verificado que este era inferior a 5 µM, uma nova faixa de concentração era testada de maneira que, o valor de IC₅₀ calculado estivesse dentro da faixa de concentração em análise e sua determinação não fosse feita por extrapolação de dados. Avaliou-se nos ensaios de IC₅₀ 100 compostos selecionados previamente na triagem.

Os valores de IC₅₀ foram determinados a partir das equações de reta geradas pela construção dos gráficos de porcentagem de inibição *versus* log da concentração do inibidor.

2.2.5 Estudos de relação estrutura e atividade (REA)

Nos estudos de REA verificam-se possíveis padrões estruturais que possam ser relacionados com a inibição enzimática. A partir destes padrões, futuras estruturas poderão ser projetadas a fim de potencializar a atividade inibitória do composto.

Com exceção dos complexos de vanádio e os compostos naturais, os demais compostos estão dispostos em séries sendo estas nomeadas pela pessoa responsável por sua síntese. As séries receberam nomes dados por uma ou mais letras (exemplo série H, série KP, série GSQ). A cada composto pertencente a uma série foi associado um número que identifica aquele composto (exemplo composto GSQ159).

Para realizar os estudos de REA estas séries foram então agrupadas onde estruturas químicas semelhantes foram mantidas em um único grupo. No total, quatro grupos foram criados sendo o grupo 1, 2 e 3 para as séries mencionadas e o grupo 4 para os complexos de vanádio:

- Grupo 1: série Ea e chalconas precursoras
- Grupo 2: séries AN, BC, JA, JE, KP, N, PM e PY
- Grupo 3: séries B, H, HB e GSQ
- Grupo 4: Complexos de vanádio

Comparou-se os membros de um mesmo grupo quanto aos seus valores de IC_{50} (obtidos para a YopH) e suas estruturas químicas para identificação de padrões estruturais possivelmente relacionados à inibição enzimática. Entre os parâmetros avaliados têm-se as posições de substituições, presença ou não de grupos retiradores ou doadores de elétrons, polaridade e tamanho dos substituintes.

2.2.6 Ensaios de seletividade dos inibidores

O ensaio de seletividade tem por objetivo averiguar se um determinado composto apresenta uma maior predileção por uma enzima frente às outras enzimas da mesma família. Para verificar esta característica, determina-se o valor de IC_{50} do composto em diferentes fosfatases e em seguida faz-se a relação do valor encontrado com o valor da enzima da qual se deseja verificar se o composto apresenta uma maior predileção (no caso deste trabalho a enzima de referência é a YopH e a relação é dada por $IC_{50}PTP/IC_{50}YopH$). Desta maneira determina-se o chamado índice de seletividade (SI - do inglês *selectivity index*). Valores de índice de seletividade maiores que 1 indicam compostos mais seletivos, valores iguais a 1 mostram igual seletividade por ambas enzimas e valores inferiores a 1 indicam que o composto é mais seletivo para a outra enzima da mesma família.

Um total de 24 compostos foram testados nas fosfatases humana LYP, PTP1B e PTP-PEST e em PtpA e PtpB de Mtb (em alguns casos, devido à quantidade limitada disponível do composto, foram escolhidas três destas seis fosfatases para realização do teste de seletividade).

Para a determinação do índice de seletividade determinou-se os valores de IC_{50} nas outras fosfatases reproduzindo as mesmas condições testadas nos ensaios de IC_{50} da YopH com pequenas modificações. As modificações feitas são quanto a concentração final de cada enzima (85 nM PtpA, 22 nM PtpB, 103 nM PTP-PEST, 25 nM PTP1B e 113 nM

LYP) e a temperatura de incubação com o composto avaliado que, no caso da PtpA, foi à temperatura ambiente. Em seguida fez-se a relação $IC_{50}PTP / IC_{50}YopH$. Os ensaios foram feitos em triplicata em três dias distintos.

2.2.7 Determinação dos parâmetros cinéticos da YopH

Dezoito compostos (Ea2, Ea3, Ea6, Ea10, Ea16, Ea24, PM1, JE02, JA10, B75, B78, GSQ159, Complexo 1, Complexo 2, Complexo 3, EUFR163, Delfinidina e AAA) foram selecionados para proceder com a determinação dos parâmetros cinéticos (K_m , $V_{m\acute{a}x}$ e K_i) e do tipo de inibição exercida.

Nos ensaios cinéticos, a atividade enzimática da YopH foi avaliada frente à presença de três concentrações distintas de cada composto. A seleção destas concentrações foi feita baseada nos valores de IC_{50} obtidos nos ensaios anteriormente citados. Assim como na triagem e nos ensaios de IC_{50} , a cinética enzimática foi feita em microplaca, com o substrato sintético *p*NPP e um volume final de reação de 200 μ L.

As condições dos testes foram as seguintes: Imidazol 20 mM pH 7; sete concentrações distintas de *p*NPP (0,2 mM a 12,8 mM); três concentrações distintas do inibidor avaliado; YopH 13 nM. A enzima foi incubada por 10 minutos a 37 °C antes da adição do substrato. A velocidade da reação foi medida espectrofotometricamente e expressa em atividade específica (liberação de 1 μ mol *p*NP $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de YopH) que foi calculada a partir do valor de absortividade molar de 4.900 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

O mecanismo de inibição enzimática foi determinado pelos gráficos de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk onde o intercepto no eixo x corresponde à $1/K_m$ e o intercepto no eixo y $1/V_{m\acute{a}x}$. Estes gráficos são obtidos pela linearização das curvas de Michaelis-Menten as quais, representam a relação da velocidade da reação catalítica pela variação da concentração de substrato. A linearização destas curvas é obtida pela equação:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x} [S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

Sendo K_m a constante de Michaelis-Menten, $V_{\text{máx}}$ a velocidade máxima da reação e $[S]$ a concentração de substrato.

Após a determinação do tipo de inibição procedeu-se para a determinação dos valores de K_i dos inibidores. Para os inibidores competitivos, ou seja, aqueles cujas retas nos gráficos de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk convergem no sobre o eixo y, o valor de K_i foi calculado através da equação da reta gerada no gráfico de valores de K_m aparente versus a concentração de composto. A partir da equação de reta calcula-se o valor do intercepto no eixo x, este valor corresponde a menos K_i . O valor de K_i para inibidores não competitivos foi determinado a partir da equação da reta gerada pelo gráfico $1/V_{\text{máx}}$ aparente versus a concentração do inibidor. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0 para construção dos gráficos e as reações foram feitas em duplicata, em dois dias diferentes.

2.2.8 Modelagem molecular

A modelagem molecular dos compostos P4 e P11 foi realizada no Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC) do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, pelos professores Dr. Rafael V. C. Guido e Dr. Adriano D. Andricopulo. As estruturas 3D foram construídas com o programa SYBYL 8.0. As moléculas tiveram as suas conformações energética otimizadas com o uso algoritmos (*Tripes force field e Powell conjugate gradient* (POWELL, 1977)) foi utilizado um critério de convergência de 0,05 kcal/mol Å e cargas GasteigereHückel (GASTEIGER e MARSILI, 1980). Para investigar a possível conformação de ligação dos ligantes do sítio de interação com a YopH, foram utilizados a inserção molecular (*molecular docking*) e os protocolos de pontuação como implementado em GOLD (JONES et al., 1997). A estrutura da YopH depositada no *Protein Data Bank* (PDB) sob o código 1PA9 foi utilizada nas simulações (SUN et al., 2003). Possíveis protonações e estados tautoméricos foram checados manualmente com Pymol 1.2 (DeLano Scientific, San Carlos, USA). A área compreendida por uma esfera de 20 Å de raio, centrada no resíduo Ile281, foi utilizada para definir o sítio

catalítico, incluindo uma molécula de água W810 que foi considerada parte deste nas simulações de inserção. O procedimento de inserção foi repetido 30 vezes para cada inibidor. A conformação representativa de cada inibidor foi selecionada a partir de inspeção visual e pontuações implementadas *GOLDscore*.

A modelagem molecular dos complexos de vanádio e de seus ligantes foi realizada pelo Dr. Mattia Mori, sob supervisão do Dr. Bruno Botta, do Instituto de Tecnologia Italiano *Center for Life NanoScience Sapienza* (Roma, Itália) e o Departamento de Química e Tecnologia do Fármaco da Universidade de Roma (Roma, Itália).

A estrutura cristalográfica da YopH, depositada no PDB sob o número 3F9B, foi a escolhida para realizar a modelagem pela sua alta resolução (1,42 Å) (BRANDÃO et al., 2009). A inserção molecular foi feita com três programas diferentes. Na inserção com AutoDock 4.2 (MORRIS, RUTH, et al., 2009) a área de ligação foi definida por um cubo 70x70x70 pontos centrado no átomo de enxofre da cisteína catalítica Cys403 com um espaçamento de 0,375 Å. As 10 conformações mais estáveis geradas pela otimização DFT foram inseridas com o programa FRED (versão 3.0.1). A inserção com o programa GOLD (versão 5.2.2) foi feita com o uso de funções *PLP*, *Chemscore* e *Goldscore*. Em todos os casos o receptor foi centrado no átomo de enxofre da cisteína catalítica com um raio de 16 Å. A acurácia da inserção foi melhorada até 200 % e todos os outros parâmetros foram mantidos nos seus valores padrão.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Inibição enzimática da proteína fosfotirosina fosfatase YopH

A PTP YopH produzida pelas espécies patogênicas do gênero *Yersinia* é de grande importância para a colonização e disseminação destas bactérias. Os autores Viboud e Bliska demonstraram que esta enzima, em conjunto com a YopE, contribuem para a resistência à fagocitose apresentada pela *Y. pseudotuberculosis* (VIBOUD e BLISKA, 2005). Ao prevenir a fagocitose, a bactéria evita a morte por células de defesa do organismo como os macrófagos e leucócitos polimorfonucleares. A relevância do papel da YopH na atividade antifagocitária da bactéria fica bem demonstrada devido ao fato que mutantes do gene codificante desta enzima são incapazes de colonizar linfonodos mesentéricos por serem normalmente eliminados pelos macrófagos no intestino delgado (GROSDENT et al., 2002; LOGSDON e MECSAS, 2003; WESTERMARK et al., 2014).

Distintas classes químicas de inibidores desta PTP são descritas na literatura. O inibidor mais potente relatado até o presente momento é o ácido aurintricarboxílico (ATA), com valores de IC_{50} de 10 nM e K_i de 5 nM. Este composto é capaz de inibir a YopH *in vitro* e *in vivo*, e é ao menos seis vezes mais seletivo para esta enzima quando comparado com outras fosfatases humanas (LIANG et al., 2003). A tabela 1 mostra alguns inibidores da YopH descritos na literatura.

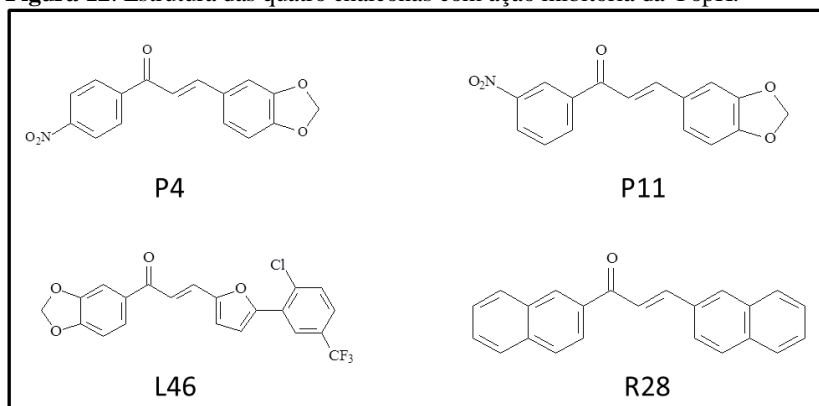
Tabela 1. Inibidores da proteína tirosina fosfatase YopH com seus respectivos valores de IC_{50} .

Inibidor	YopH IC_{50}	Referências
Ácido α -cetocarboxílico	0,7 - 200 μ M	(CHEN e SETO, 2002)
Ácido aurintricarboxílico	0,010 μ M	(LIANG et al., 2003)
Tripeptídeos	1,8 μ M	(LEE et al., 2003)
Derivados furanil-salicilato	0,18 - 0,46 μ M	(TAUTZ et al., 2005)
Derivados do ácido salicílico	1,2 - 20 μ M	(HUANG et al., 2010)
Derivados fosfanados de calixarenos	0,22 - 570 μ M*	(VOVK et al., 2010)
Isotiazolidinonas	2-78 μ M	(KIM et al., 2011)
Oximas	0,19 μ M	(BAHTA et al., 2011) (HOGAN et al., 2013)
Derivados de piraminotriazino-diona e dimetilpirimidina-diona	0,88 - 9,89 μ M	(HU et al., 2013)

* Valores de K_i

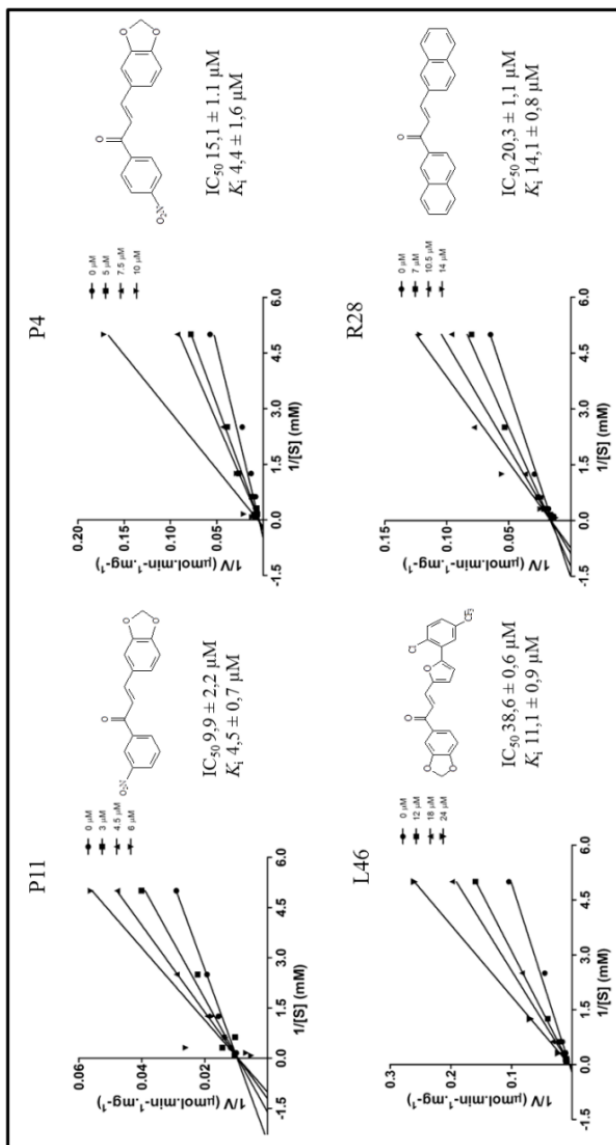
Com a finalidade de encontrar inibidores para esta fosfatase, em 2009 foi iniciado em nosso laboratório um trabalho de triagem. Entre 2009 e 2010 uma biblioteca de 265 diferentes compostos foi testada. A partir dos ensaios de triagem e de IC_{50} chegou-se a 4 chalconas (figura 12) com capacidade de inibir a YopH. Estes inibidores apresentaram valores de IC_{50} que variavam de 9,9 a 38,6 μM . Estudos preliminares de cinética enzimática mostravam uma inibição da YopH do tipo competitiva. Estes dados preliminares foram apresentados na dissertação de Mestrado da presente autora (MARTINS, 2010).

Figura 12. Estrutura das quatro chalconas com ação inibitória da YopH.



Em 2011, dando continuidade ao estudo de inibição da YopH com estes compostos, foram realizadas novas cinéticas acrescentando-se mais uma concentração de cada chalcona (3 concentrações do composto e a enzima com o solvente DMSO). Os dados cinéticos previamente obtidos foram confirmados, e as 4 chalconas apresentam inibição competitiva da YopH com valores de K_i variando de 4,4 a 14,1 μM (Figura 13).

Figura 13. Cinéticas enzimáticas, estrutura das chalconas, valores de K_i e IC_{50} .

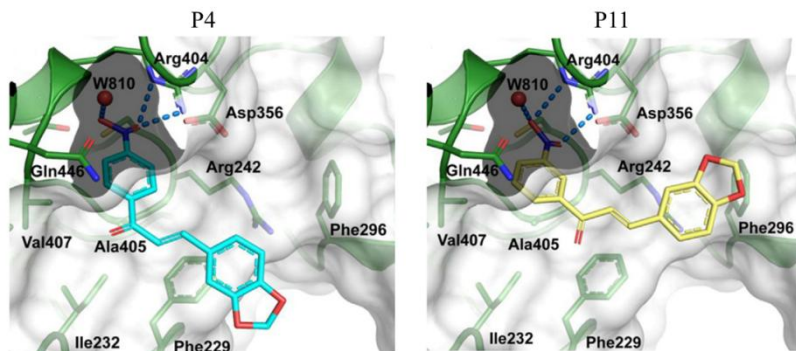


As quatro chalconas mostradas apresentam inibição do tipo competitiva, onde as retas obtidas nos gráficos convergem no eixo Y característica típica deste tipo de inibição. Os valores de K_i encontrados variam de 4,4 a 14,1 μM .

Estudos de modelagem molecular dos dois melhores inibidores desta série (P4 e P11) foram realizados para avaliar as possíveis interações com o sítio catalítico da enzima. A modelagem molecular foi realizada no Laboratório de Química Medicinal e Computacional do Instituto de Física da USP de São Carlos. Os dados obtidos a partir desta análise (figura 14) mostram que ambas chalconas orientam o substituinte nitrofenil em direção ao sítio catalítico da YopH. O grupo nitro faz interações iônicas com as cadeias laterais da arginina 409 e uma molécula de água W810 que age como doadora de ligações hidrogênio. Além destas interações citadas há ainda interações do tipo van der Waals e hidrofóbicas entre a YopH e estes inibidores.

Os resultados obtidos na triagem iniciada no trabalho de Mestrado foram então unidos aos resultados obtidos com outros compostos testados pela Dra. Angela Camila Orbem Menegatti (MENEGATTI, 2014) e publicados em 2013 na revista *European Journal of Medicinal Chemistry* (MARTINS et al., 2013) (Apendice A). Este foi o primeiro relato na literatura da ação de chalconas e sulfonamidas como inibidores da YopH.

Figura 14. Modelagem molecular dos compostos P4 e P11



Nas modelagens realizadas com os compostos P11 e P4 é evidenciado a projeção do substituinte nitrofenil em direção do sítio catalítico da YopH. Podem-se verificar as interações iônicas entre o grupo nitro e as cadeias laterais da arginina 409 e uma molécula de água W810

2.3.2 Triagem de novos compostos com capacidade inibitória da atividade catalítica da YopH

Ainda com o intuito de identificar novos possíveis inibidores da YopH, uma nova biblioteca de 398 compostos foi avaliada *in vitro* a partir de 2011. Estes compostos foram testados na concentração final de 25 μM e suas capacidades inibitórias foram avaliadas frente a 13 nM da YopH recombinante. Os compostos foram incubados a 37 °C por 10 minutos com a enzima antes da adição do substrato sintético (*p*-nitrofenilfosfato – *p*NPP) à concentração final de 20 mM.

Estes compostos também foram testados nas PTP de Mtb, PtpA (85 nM concentração final) e PtpB (22 nM concentração final). Uma parte dos ensaios com estas duas PTP foi realizada pela Dra. Angela Camila Orbem Menegatti e também estão apresentados em sua tese de Doutorado (MENEGATTI, 2014).

É importante destacar que, apesar do foco deste trabalho ser a busca de inibidores da YopH, a triagem dos novos compostos foi realizada nas três PTP (PtpA, PtpB e YopH) porque além de ser um procedimento padrão em nosso laboratório, serve como base para estudos futuros, ou seja, determina-se qual enzima é mais inibida por uma certa classe química e, posteriormente, novas moléculas daquela classe poderão ser sintetizadas com o objetivo de conseguir inibidores mais

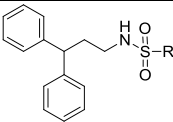
Como citado anteriormente, a partir dos resultados obtidos na primeira triagem de inibidores (2009-2010) descobriu-se o potencial das chalconas e sulfonamidas como inibidores da YopH, e assim foram sintetizados outros compostos destas duas classes químicas para a nova triagem realizada a partir de 2011..


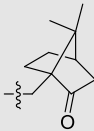
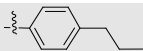

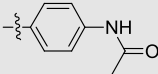
Sulfonamidas possuem ação antibacteriana. A sulfonilamida, um exemplo de sulfonamida, foi o primeiro agente antibacteriano sintético de amplo espectro contra infecções. Sabe-se que um dos alvos desta classe de compostos é a enzima di-hidropteroato sintetase, ao inibi-la a sulfonamida bloqueia a síntese de tetrahidrofolato na parede celular prevenindo o crescimento e a multiplicação bacteriana (bacteriostático) (PATRICK, 2009). Em 2007, foi demonstrado por Grunder e colaboradores que a (oxalilamino-metileno)-tiofeno sulfonamida (OMTS), em particular, conferiu excelente inibição da PtpB com um IC_{50} de 0,44 μM (GRUNDNER et al., 2007).

Por seus potenciais como possíveis inibidores de fosfatases, 31 novas sulfonamidas foram triadas contra a PtpA, PtpB e YopH. Também foi avaliada a capacidade inibitória de 8 sulfoniltiouréias nas

três fosfatases. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 2. Dos 39 compostos destas classes químicas, somente um (DFS8) apresentou inibição superior a 50% da atividade da YopH.

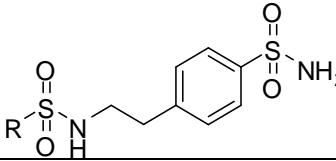
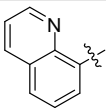
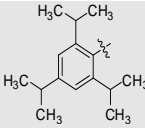
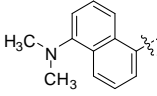
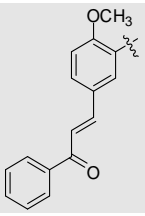
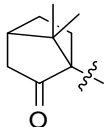
Tabela 2. Sulfonamidas e sulfoniltiouréias sintéticas com seus respectivos resultados de inibição das enzimas YopH, PtpA e PtpB.



Sulfonamidas Derivadas da OMTS	R	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA	Inibição % da PtpB
DFS1	Fenil	3,22 ± 3,13	1,60 ± 2,87	si
DFS2	4-Br-fenil	7,74 ± 1,63	3,69 ± 1,65	si
DFS3	3,4-diCl-fenil	33,00 ± 8,87	7,49 ± 5,02	3,81 ± 4,19
DFS4	2,4,6-triisopropil-fenil	26,70 ± 1,60	0,90 ± 4,04	si
DFS5	4-NO ₂ -fenil	18,17 ± 3,88	16,49 ± 2,59	12,96 ± 2,15
DFS6		11,00 ± 0,95	12,60 ± 1,24	si
DFS7		39,20 ± 1,60	10,26 ± 2,87	si
DFS8	4-Cl-fenil	55,36 ± 3,01	9,15 ± 0,26	si
DFS9		36,78 ± 3,67	7,53 ± 3,79	si
DFS10		25,09 ± 4,44	10,86 ± 9,22	si
DFS11	2,5-diCl-fenil	24,51 ± 2,41	15,91 ± 4,92	2,70 ± 2,97
DFS12	4-F-fenil	2,10 ± 3,96	13,87 ± 4,41	si
DFS13	4-OCH ₃ -fenil	28,42 ± 7,45	7,93 ± 7,66	si
DFS14	4-CH ₃ -fenil	29,56 ± 13,85	7,04 ± 1,51	si
DFS15		si	2,61 ± 5,09	si

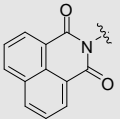
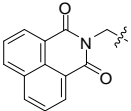
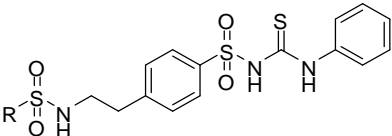
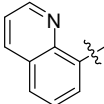
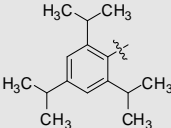
Continua...

Continua...

				
Sulfonamidas	R	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA *	Inibição % da PtpB *
Gli1a	Fenil	5,16 ± 2,46	18,03 ± 5,92	5,47 ± 5,81
Gli2a		11,97 ± 2,93	14,69 ± 2,63	25,78 ± 2,49
Gli3a	4-F-fenil	5,73 ± 7,85	21,26 ± 4,32	si
Gli4a	4-CH ₃ -fenil	10,38 ± 3,50	5,30 ± 2,68	si
Gli5a		26,30 ± 7,17	2,50 ± 0,29	9,21 ± 2,13
Gli6a	4-Cl-fenil	15,81 ± 2,66	21,99 ± 3,62	si
Gli7a	3,4-Cl ₂ -fenil	12,95 ± 6,64	14,22 ± 4,35	si
Gli8a		8,49 ± 2,97	si	si
Gli9a		32,88 ± 15,91	14,73 ± 4,57	9,51 ± 1,80
Gli10a		18,66 ± 13,10	si	si
Gli12a	4-NO ₂ -fenil	2,31 ± 1,41	7,43 ± 3,00	25,59 ± 5,59
Gli13a	4-Br-fenil	si	1,39 ± 1,82	12,28 ± 0,40
Gli14a	4-OCH ₃ -fenil	si	2,24 ± 6,59	si
Gli15a	2-tiofeno	si	6,22 ± 0,16	si

Continua...

Continua...

Gli18a		33,09 ± 8,33	16,59 ± 4,29	28,00 ± 1,79
Gli20a		si	si	38,54 ± 6,39
				
Sulfonilthio- ureias	R	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA *	Inibição% da PtpB *
Gli1c	fenil	35,45 ± 9,80	0,06 ± 4,28	46,78 ± 9,21
Gli2c		si	8,90 ± 5,97	21,82 ± 0,78
Gli3c	4-F-fenil	si	si	16,10 ± 3,82
Gli4c	4-CH ₃ -fenil	12,61 ± 5,34	13,50 ± 4,21	24,83 ± 0,86
Gli5c		18,42 ± 4,14	16,12 ± 7,41	44,56 ± 1,19
Gli6c	4-Cl-fenil	si	7,74 ± 4,79	23,94 ± 1,25
Gli14c	4-OCH ₃ -fenil	si	13,51 ± 2,39	27,80 ± 3,24
Gli15c	2-tiofeno	si	17,59 ± 1,69	33,78 ± 3,84

* Dados pertencentes à tese de Doutorado de Angela C. O. Menegatti; si = Sem inibição; valores destacados: compostos que apresentaram inibição da atividade da YopH superior a 50%, considerando o desvio.

As chalconas são compostos intermediários na biossíntese de flavonoides e podem ser isoladas de plantas ou obtidas sinteticamente através de métodos clássicos. Em sua estrutura há dois anéis aril ligados a uma cetona α,β insaturada (BOŽIĆ et al., 2014). Diversas atividades biológicas são atribuídas a esta classe química, entre elas: anti-giardia (BAHADUR et al., 2014), antibacteriana (ÁVILA et al., 2008; SIVAKUMAR et al., 2010; HUSAIN et al., 2013), anti-inflamatória (WON et al., 2005); antifúngica (SIVAKUMAR et al., 2009), antimalária (HAYAT et al., 2011) e antileishmania (IMAN et al., 2014).

Além destas atividades, nosso grupo de pesquisa demonstrou que chalconas também possuem atividade inibitória de PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* (CHIARADIA et al., 2008; MASCARELLO et al., 2010; CHIARADIA et al., 2012).

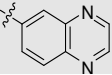
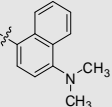
No presente trabalho foram testadas 190 chalconas ou bis-chalconas sintéticas. Destas, 64 apresentaram inibição da YopH superior a 50 % (considerando o valor do desvio). A porcentagem de inibição da PtpA, PtpB e YopH, juntamente com a estrutura dos compostos testados são apresentadas na tabela 3.

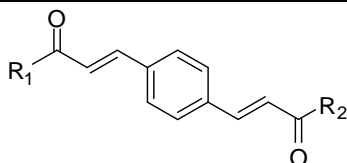
Tabela 3. Chalconas e bis-chalconas sintéticas com seus respectivos resultados de inibição das enzimas YopH, PtpA e PtpB.

Bis-chalconas	R1 = R2	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA *	Inibição % da PtpB *
BC1	4-OCH ₃ -fenil	27,40 ± 13,44	35,45 ± 7,50	39,13 ± 4,71
BC2	3,4,5-triOCH ₃ - fenil	33,87 ± 19,15	14,25 ± 1,09	1,95 ± 7,19
BC4	3,4-diOCH ₃ - fenil	18,42 ± 1,00	19,92 ± 5,01	8,18 ± 3,19
BC6	3,4- metilenodióxi fenil	52,52 ± 8,22	34,23 ± 0,31	42,06 ± 1,93
BC7	2,5-diOCH ₃ - fenil	80,07 ± 11,39	32,42 ± 1,32	40,89 ± 2,48
BC8	2-naftil	73,59 ± 9,84	35,30 ± 0,53	47,67 ± 7,93
BC10	1-naftil	80,80 ± 3,06	40,37 ± 4,62	50,99 ± 5,19
BC11	fenil	76,76 ± 5,07	60,42 ± 1,60	77,09 ± 1,04
BC13	2,4,5-triOCH ₃ - fenil	25,42 ± 2,88	1,54 ± 2,87	si
BC14	4-COOH-fenil	46,30 ± 3,84	64,42 ± 1,65	31,38 ± 1,25

Continua...

Continua...

BC15	2,4,6-triOCH ₃ - fenil	8,27 ± 1,77	5,56 ± 4,09	9,32 ± 6,61
BC16	3-OCH ₃ ,4-OH- fenil	3,55 ± 2,76	1,08 ± 2,94	1,02 ± 5,14
BC17		59,15 ± 4,21	22,55 ± 2,47	29,35 ± 0,79
BC18	4-N(CH ₃) ₂ -fenil	78,44 ± 3,81	53,53 ± 2,79	60,36 ± 0,97
BC19		91,43 ± 1,89	73,15 ± 1,18	82,67 ± 4,37
BC20	2,6-diOCH ₃ - fenil	42,71 ± 22,70	24,87 ± 0,22	36,32 ± 0,55
BC21	2,3,4-triOCH ₃ - fenil	5,74 ± 1,27	12,60 ± 1,36	23,20 ± 0,52

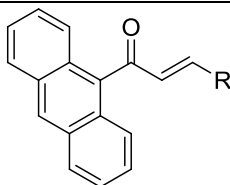


Bis-chalconas	R1 = R2	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA*	Inibição % da PtpB*
PM1	4-OCH ₃ -fenil	97,63 ± 0,55	67,31 ± 1,65	82,06 ± 0,48
PM2	3,4,5-triOCH ₃ - fenil	14,45 ± 3,84	16,30 ± 1,74	si
PM3	3-OCH ₃ -fenil	28,53 ± 2,26	14,29 ± 4,45	5,74 ± 0,21
PM4	3,4-diOCH ₃ - fenil	15,77 ± 0,95	13,05 ± 4,66	si
PM5	2,4-diOCH ₃ - fenil	23,16 ± 2,73	7,41 ± 3,88	si
PM6	3,4-OCH ₂ O- fenil	82,96 ± 4,66	46,69 ± 1,92	54,67 ± 4,37
PM7	2,5-diOCH ₃ - fenil	33,68 ± 7,32	13,69 ± 6,31	20,59 ± 1,07
PM8	2-naftil	91,07 ± 4,44	67,76 ± 0,56	76,12 ± 2,52

Continua...

Continua...

PM9	3,5-diOCH ₃ -fenil	26,40 ± 4,94	7,72 ± 4,57	23,63 ± 11,06
PM10	1-naftil	51,85 ± 16,11	22,67 ± 2,32	27,07 ± 2,42
PM11	fenil	93,34 ± 3,02	53,59 ± 1,01	60,00 ± 3,07
PM12	2-OCH ₃ -fenil	27,00 ± 3,08	si	14,25 ± 2,34
PM13	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	17,25 ± 3,78	4,01 ± 0,59	7,61 ± 3,48
PM14	4-COOH-fenil	19,56 ± 1,59	29,22 ± 2,88	18,08 ± 0,17
PM15	2,4,6-triOCH ₃ -fenil	46,92 ± 13,68	25,93 ± 0,13	40,60 ± 3,16
PM16	3-OCH ₃ ,4-OH-fenil	0,34 ± 5,85	15,69 ± 2,03	18,37 ± 2,20

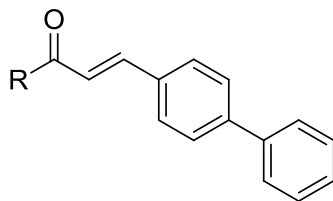


Chalcona	R	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA	Inibição % da PtpB
AN1		55,39 ± 1,07	26,80 ± 14,13	31,34 ± 15,92
AN2		64,41 ± 3,34	31,66 ± 10,77	28,05 ± 13,39
AN3	4- OCH ₃ -fenil	48,31 ± 1,27	22,09 ± 4,73	16,66 ± 18,40
AN4	4-metil-fenil	50,59 ± 0,56	26,14 ± 6,17	25,24 ± 3,27
AN5	4-Cl-fenil	35,91 ± 2,76	16,80 ± 5,71	15,72 ± 14,91
AN6	3,4-diCl-fenil	50,05 ± 4,07	19,60 ± 5,44	24,28 ± 2,31

Continua...

Continua...

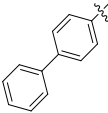
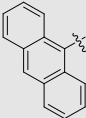
AN7	3,4-metilenodióxi-fenil	74,02 ± 11,80	37,74 ± 9,77	39,93 ± 7,86
AN8	3-NO ₂ -fenil	63,19 ± 8,21	40,85 ± 2,64	29,38 ± 12,58
AN9	4-NO ₂ -fenil	57,90 ± 5,18	31,29 ± 5,47	36,64 ± 0,98
AN10	2,6-diOCH ₃ -fenil	58,31 ± 1,05	23,18 ± 7,28	33,59 ± 11,97
AN11	2,5-diOCH ₃ -fenil	56,50 ± 0,74	35,20 ± 11,14	22,60 ± 20,86
AN12	3,4-diOCH ₃ -fenil	56,33 ± 6,88	43,84 ± 5,95	28,76 ± 21,17
AN13	Fenil	33,36 ± 1,05	26,41 ± 2,27	26,35 ± 11,62
AN15	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	65,90 ± 7,47	29,15 ± 3,10	45,9 ± 1,30

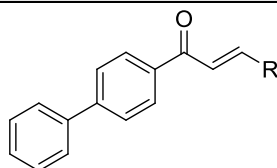


Chalcona	R	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA	Inibição % da PtpB
JA1	Fenil	62,32 ± 20,85	17,98 ± 6,29	4,32 ± 1,90
JA2	4-NO ₂ -fenil	93,64 ± 5,82	34,30 ± 0,86	31,46 ± 9,67
JA3	2,5-diOCH ₃ -fenil	41,24 ± 15,05	14,71 ± 6,74	8,37 ± 5,59
JA4	3,4-diOCH ₃ -fenil	12,96 ± 3,61	11,68 ± 5,78	11,44 ± 13,17
JA5	3-NO ₂ -fenil	44,01 ± 9,18	8,83 ± 6,10	19,41 ± 4,28
JA6	3,4-metilenodióxi-fenil	52,20 ± 10,39	6,29 ± 5,47	si

Continua...

Continua...

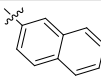
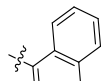
JA7	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	22,87 ± 5,19	14,52 ± 6,29	1,84 ± 9,23
JA8	4-OCH ₃ -fenil	29,74 ± 3,08	6,81 ± 4,11	11,29 ± 6,47
JA9	3,4-diCl-fenil	30,60 ± 8,11	19,86 ± 9,15	20,36 ± 2,88
JA10		96,36 ± 2,90	51,97 ± 2,17	82,50 ± 7,60
JA11	3,5-diOCH ₃ -fenil	32,93 ± 11,64	26,34 ± 3,71	0,05 ± 11,13
JA12	2-naftil	24,25 ± 5,13	7,22 ± 6,68	21,75 ± 6,41
JA13	1-naftil	36,32 ± 6,87	8,63 ± 9,64	19,06 ± 11,73
JA14	4-CH ₃ -fenil	19,81 ± 8,23	20,84 ± 3,01	25,25 ± 13,11
JEKP		88,12 ± 8,28	56,14 ± 2,23	74,24 ± 0,25

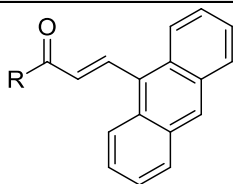


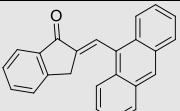
Chalcona	R	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA	Inibição % da PtpB
JE2	4-NO ₂ -fenil	98,56 ± 0,44	94,22 ± 1,23	96,15 ± 4,93
JE3	4-CH ₃ -fenil	39,90 ± 0,23	10,39 ± 11,35	12,44 ± 9,34
JE4	3-NO ₂ -fenil	44,28 ± 2,43	9,82 ± 14,27	2,27 ± 3,65
JE5	4-Cl-fenil	86,31 ± 7,92	27,71 ± 16,94	34,67 ± 1,77
JE6	3-OCH ₃ -4-OH-fenil	si	1,93 ± 2,88	si

Continua...

Continua...

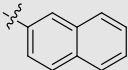
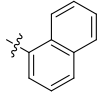
JE7	Fenil	65,34 ± 1,23	20,03 ± 13,12	20,10 ± 4,30
JE8	4-OCH ₃ -fenil	28,59 ± 10,40	15,53 ± 6,80	si
JE9	3,4-diCl-fenil	66,10 ± 3,12	23,26 ± 17,01	9,52 ± 10,81
JE10	3,4-metilenodióxi	55,76 ± 35,62	6,96 ± 4,94	si
JE11	3,6-diOCH ₃ -fenil	28,85 ± 8,87	9,36 ± 15,54	1,12 ± 15,02
JE13	2,6-diOCH ₃ -fenil	26,43 ± 9,59	11,17 ± 0,03	si
JE15		95,65 ± 2,66	48,47 ± 7,46	45,70 ± 8,44
JE16	3,4-diOCH ₃ -fenil	12,07 ± 11,40	7,81 ± 3,25	si
JE17		42,97 ± 4,46	6,76 ± 9,77	10,99 ± 4,89
JE18	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	19,18 ± 3,15	15,93 ± 4,22	si

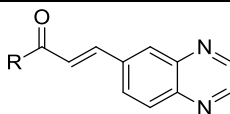


Chalcona	R	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA	Inibição % da PtpB
KP1	 †	57,58 ± 1,01	19,42 ± 9,19	17,14 ± 13,46
KP2	4-NO ₂ -fenil	89,49 ± 0,88	50,50 ± 8,16	44,79 ± 11,32
KP3	3,4-diOCH ₃ -fenil	33,30 ± 2,04	28,48 ± 7,42	9,89 ± 13,35

Continua...

Continua...

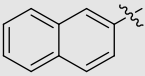
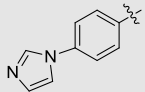
KP4	3,5-diOCH ₃ - fenil	21,04 ± 6,26	13,45 ± 9,16	6,88 ± 0,33
KP5	2,4-diOCH ₃ - fenil	30,42 ± 5,18	18,79 ± 7,86	8,24 ± 3,00
KP7	2,6-diOCH ₃ - fenil	30,66 ± 9,02	19,14 ± 8,49	2,18 ± 5,52
KP8		34,98 ± 1,39	19,03 ± 5,77	13,85 ± 9,39
KP9		29,73 ± 1,85	17,86 ± 10,10	15,87 ± 2,72
KP10	3-NO ₂ -fenil	49,98 ± 12,22	17,17 ± 8,79	19,32 ± 2,54
KP12	3-OH-4-OCH ₃ - fenil	50,82 ± 5,22	21,84 ± 4,82	si
KP13	3,4- metilenodióxi- fenil	51,42 ± 3,83	18,50 ± 7,06	si
KP14	3,4,5-triOCH ₃ - fenil	18,77 ± 8,14	18,30 ± 3,15	6,45 ± 10,71

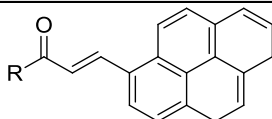


Chalcona	R	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA	Inibição % da PtpB
N2	4-OCH ₃ -fenil	4,79 ± 10,25	26,86 ± 0,47	2,52 ± 2,56
N3	3,4- metilenodióxi- fenil	8,32 ± 7,01	14,09 ± 1,08	25,08 ± 6,94
N4	4-Br-fenil	46,18 ± 6,70	37,06 ± 2,62	13,09 ± 0,92
N5	fenil	19,35 ± 0,03	21,87 ± 7,71	0,02 ± 4,30
N7	4-NO ₂ -fenil	68,62 ± 13,51	48,44 ± 0,42	42,29 ± 0,40
N9	2,5-diOCH ₃ - fenil	16,43 ± 6,59	5,74 ± 7,28	7,35 ± 1,46

Continua...

Continua...

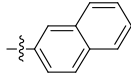
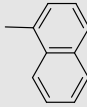
N10	3,4-diOCH ₃ - fenil	8,84 ± 4,94	si	21,51 ± 6,07
N12	2,4-diOCH ₃ - fenil	7,76 ± 7,45	si	13,6 ± 6,10
N14		26,99 ± 0,25	10,12 ± 1,48	30,81 ± 0,14
N15	3,4,5-triOCH ₃ - fenil	16,79 ± 5,82	0,15 ± 3,81	14,36 ± 5,09
N16	3-OCH ₃ -4-OH- fenil	14,59 ± 0,57	0,62 ± 0,81	27,09 ± 12,71
N17	2,4,5-triOCH ₃ - fenil	15,89 ± 5,18	4,31 ± 10,81	0,12 ± 14,55
N18	3,5-diOCH ₃ - fenil	2,93 ± 8,37	si	si
N19	2-OCH ₃ fenil	30,90 ± 4,56	2,67 ± 2,46	si
N20	3,5-diOCH ₃ -4- OH-fenil	10,53 ± 4,01	0,84 ± 0,63	6,68 ± 12,12
N23	3-OCH ₃ -fenil	10,52 ± 0,82	6,25 ± 3,84	1,78 ± 15,49
N24		20,59 ± 3,95	7,76 ± 8,50	si
N33	4-CN-fenil	24,60 ± 3,18	17,54 ± 6,20	si
N34	3-CN-fenil	32,26 ± 2,96	19,63 ± 7,72	si
N36	2,3,4-triOCH ₃ - fenil	22,20 ± 8,23	16,71 ± 1,99	0,11 ±20,13
N37	4-F-fenil	20,57 ± 21,99	12,62 ± 4,38	si

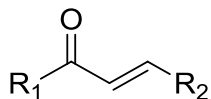


Chalcona	R	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA	Inibição % da PtpB
Py1	4-NO ₂ -fenil	96,01 ± 0,18	57,62 ± 1,20	49,25 ± 1,09

Continua...

Continua...

Py2	4-CH ₃ -fenil	42,45 ± 4,69	18,25 ± 1,86	13,49 ± 3,97
Py3	3,4-metilenodióxi-fenil	73,01 ± 2,11	24,91 ± 0,47	37,67 ± 0,80
Py4		60,20 ± 0,47	27,58 ± 5,56	20,39 ± 9,47
Py5	4-OCH ₃ -fenil	46,77 ± 0,46	22,74 ± 13,65	19,30 ± 8,93
Py6	3-OCH ₃ -4-OH-fenil	62,30 ± 10,20	29,13 ± 12,06	27,26 ± 0,44
Py7		28,79 ± 4,07	14,67 ± 13,78	13,60 ± 3,11
Py8	3,4-diOCH ₃ -fenil	20,27 ± 2,84	21,86 ± 6,98	19,68 ± 7,81
Py9	2,5-diOCH ₃ -fenil	37,52 ± 5,54	24,28 ± 8,48	4,29 ± 6,07
Py10	3,4-diCl-fenil	79,25 ± 3,54	31,92 ± 2,88	29,10 ± 7,54
Py11	3-NO ₂ -fenil	91,78 ± 0,49	49,61 ± 5,83	50,21 ± 14,35
Py12	2,4-diOCH ₃ -fenil	53,59 ± 4,44	30,33 ± 1,91	13,71 ± 1,73
Py13	3,5-diOCH ₃ -fenil	46,42 ± 2,65	24,45 ± 5,44	17,40 ± 25,01
Py14	fenil	35,10 ± 9,23	23,34 ± 12,68	si
Py15	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	36,56 ± 3,97	30,61 ± 1,27	33,46 ± 8,70

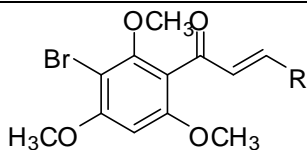


Chalconas	R1	R2	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA	Inibição % da PtpB
ML1	2,5-diOH-fenil	2-NO ₂ -fenil	si	si	si

Continua...

Continua...

ML2	2,4-diOH-fenil	2-NO ₂ -fenil	2,13 ± 10,01	si	si
ML3	4-OH-fenil	2-NO ₂ -fenil	4,71 ± 0,91	si	si
ML4	3,4-diOH-fenil	2-NO ₂ -fenil	6,52 ± 2,23	si	si
ML5	3,5-diOH-fenil	2-NO ₂ -fenil	5,22 ± 6,82	si	7,07 ± 6,10
ML6	2-OH-fenil	2-NO ₂ -fenil	14,34 ± 4,70	2,64 ± 9,55	si
ML7	fenil	2-NO ₂ -fenil	19,95 ± 4,38	0,69 ± 15,36	si
ML9	3-OH-fenil	2-NO ₂ -fenil	26,72 ± 3,23	6,81 ± 13,32	si
ML13	4-COOH-fenil	2-NO ₂ -fenil	si	si	7,13 ± 5,60
ML14	2-NO ₂ -fenil	4-OH-fenil	6,99 ± 3,07	si	6,29 ± 11,90
ML18	2-NO ₂ -fenil	2,5-diOH-fenil	12,88 ± 3,87	si	11,11 ± 10,71
ML24	2-NO ₂ -fenil	2,6-diOH-fenil	7,59 ± 1,67	14,17 ± 17,31	4,70 ± 1,22

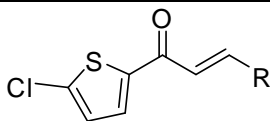


Chalconas	R	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA*	Inibição % da PtpB*
B65	1-naftil	46,51 ± 21,07	20,42 ± 6,11	23,75 ± 2,75
B66	2,5-diOCH ₃ -fenil	43,93 ± 23,34	20,82 ± 0,01	14,55 ± 4,11
B67	4-butoxi-fenil	14,18 ± 4,50	7,96 ± 3,57	15,21 ± 3,74
B74	4-CH ₃ -fenil	24,88 ± 3,76	25,18 ± 0,04	18,51 ± 11,94

Continua...

Continua...


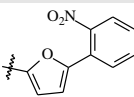
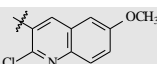
B75	3-NO ₂ -fenil	57,28 ± 11,38	57,79 ± 4,30	76,65 ± 2,90
B77	4-OCH ₃ -fenil	15,24 ± 5,32	14,70 ± 8,81	si
B78	4-Cl-fenil	84,25 ± 10,55	50,77 ± 15,38	66,55 ± 1,12
B81	2-COOH-fenil	8,23 ± 2,45	19,07 ± 1,01	3,81 ± 2,92
B83	2,3,5-triOCH ₃ -fenil	22,84 ± 1,39	15,88 ± 11,00	6,71 ± 1,91
B85	2-naftil	93,31 ± 2,10	64,44 ± 9,77	74,52 ± 3,72
B89	fenil	30,77 ± 7,00	13,00 ± 5,00	9,76 ± 6,29

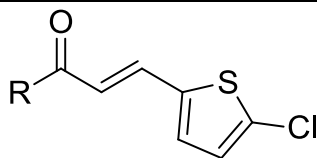


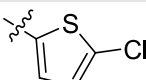
Chalconas heterocíclicas	R	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA*	Inibição % da PtpB*
H1A	fenil	6,25 ± 3,22	24,72 ± 4,9	si
H2	4-Cl-fenil	44,77 ± 1,40	54,00 ± 2,05	si
H3	4-OCH ₃ -fenil	si	5,18 ± 5,47	13,35 ± 7,62
H4	4-CH ₃ -fenil	si	7,01 ± 7,43	si
H6	3-NO ₂ -fenil	87,28 ± 2,32	78,09 ± 1,48	28,81 ± 3,02
H7	4-F-fenil	22,52 ± 3,05	35,35 ± 6,5	si
H11	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	si	25,87 ± 7,74	si
H12	2,4,6-triOCH ₃ -fenil	22,66 ± 3,68	44,62 ± 2,43	5,68 ± 3,83
H14	3,4-metilenodióxi-fenil	34,48 ± 6,14	65,30 ± 6,4	7,80 ± 2,48

Continua...

Continua...

H15	1-naftil	29,68 ± 1,35	11,00 ± 5,53	si
H16	4-butóxi-fenil	si	si	si
H17	3-OCH ₃ ,4-OH-fenil	si	16,77 ± 13,4	si
H19		31,36 ± 5,60	3,14 ± 3,14	si
H21		si	43,76 ± 4,26	si
H22		85,46 ± 3,45	68,66 ± 3,59	41,23 ± 4, 51
H24	2,5-diOCH ₃ -fenil	si	si	si
H26	4-N(CH ₃) ₂	45,09 ± 2,54	20,98 ±	si
H28	4-COOH	si	20,90 ± 0,7	21,19 ± 1,38
H29	2,3,4-triOCH ₃	13,31 ± 4,97	si	si
H30	2,6-diOCH ₃	si	5,93 ± 4,34	si



Chalconas heterocíclicas	R	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA	Inibição % da PtpB
HB1	fenil	24,80 ± 15,79	si	si
HB2		16,25 ± 20,48	0,73 ± 14,38	si
HB3	4-OCH ₃ -fenil	13,08 ± 9,85	si	si
HB4	4-CH ₃ -fenil	19,88 ± 5,22	5,66 ± 16,46	si

Continua...

Continua...

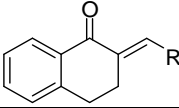
HB5	3,4-diCl-fenil	25,22 ± 11,29	9,37 ± 11,91	19,42 ± 13,78
HB6	3-NO ₂ -fenil	28,59 ± 5,71	17,05 ± 2,93	10,85 ± 12,87
HB7	4-F-fenil	27,55 ± 2,01	19,78 ± 0,65	si
HB8	4- NO ₂ -fenil	94,56 ± 1,02	56,90 ± 0,07	46,99 ± 9,87
HB9	4-Br-fenil	49,07 ± 7,82	25,63 ± 8,22	23,86 ± 10,43
HB11	2,4,5-triOCH ₃ - fenil	13,19 ± 7,18	9,74 ± 2,70	3,14 ± 13,77
HB12	2,4,6-triOCH ₃ - fenil	23,51 ± 6,80	13,33 ± 2,84	6,44 ± 14,77
HB13	3,4,5-triOCH ₃ - fenil	28,21 ± 5,08	19,82 ± 5,65	si
HB14	3,4-diOCH ₂ O- fenil	26,21 ± 0,90	12,15 ± 7,04	14,54 ± 4,88
HB15	1-naftil	40,88 ± 13,54	18,76 ± 0,61	8,06 ± 4,98
HB17	3-OCH ₃ ,4-OH- fenil	21,63 ± 4,84	18,38 ± 0,76	3,00 ± 1,48
HB24	2,5- diOCH ₃ - fenil	28,82 ± 7,84	17,46 ± 0,40	si
HB25	3,4- diOCH ₃ - fenil	12,04 ± 19,74	14,07 ± 8,10	si
HB32	3- OCH ₃ -fenil	22,81 ± 6,38	19,06 ± 14,40	87,89 ± 5,57
HB36	2- NO ₂ -fenil	35,76 ± 11,30	28,93 ± 0,28	38,58 ± 2,93
HB37	2-naftil	26,28 ± 12,22	17,06 ± 1,68	si
HB40	2,5-diCl-fenil	23,05 ± 5,90	14,81 ± 0,47	19,56 ± 2,07

* Dados pertencentes à tese de Doutorado de Angela C. O. Menegatti ; si = Sem inibição; † Representa a estrutura completa do composto; valores destacados: compostos que apresentaram inibição da atividade da YopH superior a 50%, considerando o desvio.

Tetralonas, benzosuberonas e indanonas são derivados cíclicos das chalconas e tem como característica a restrição conformacional. As tetralonas, assim como as indanonas, possuem atividade anticâncer (CHANDA et al., 2012; DEVKOTA et al., 2013). Também foi atribuída às indanonas ação antimalárica (CHARRIS et al., 2007). Benzosuberonas possuem atividades bacteriostáticas, anti-inflamatória, antipirética e anticâncer (NAGARAPU et al., 2014).


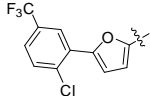
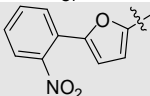
Foram testadas no presente trabalho 21 tetralonas, 10 benzosuberonas e 22 indanonas. Destes 53 compostos, 1 benzosuberona e 6 indanonas apresentaram inibição superior a 50 % da YopH. Estes dados são mostrados na tabela 4.

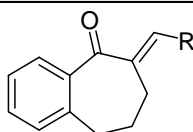
Tabela 4. Tetralonas, benzosuberonas e indanonas sintéticas com seus respectivos resultados de inibição das enzimas YopH, PtpA e PtpB.

				
Tetralonas	R	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA*	Inibição % da PtpB*
GSQ01	4-Cl-fenil	4,09 ± 10,06	si	14,71 ± 7,36
GSQ02	4-NO ₂ -fenil	3,93 ± 8,88	18,56 ± 6,30	42,54 ± 1,90
GSQ04	4-butóxi-fenil	2,33 ± 9,94	5,93 ± 1,32	0,85 ± 9,07
GSQ06	3-Br-fenil	3,46 ± 7,61	14,76 ± 5,38	si
GSQ07	4-OCH ₃ -fenil	si	11,55 ± 9,24	si
GSQ08	fenil	si	si	si
GSQ10	4-Br-fenil	si	si	0,73 ± 6,01
GSQ11	4-N(CH ₃) ₂ -fenil	40,83 ± 7,22	si	si
GSQ12	4-F-fenil	si	si	si
GSQ13	3-NO ₂ -fenil	si	si	si
GSQ14	3-Cl-fenil	si	19,46 ± 5,26	6,43 ± 4,80
GSQ16	4-CH ₃ -fenil	si	17,37 ± 6,32	8,44 ± 0,94

Continua...

Continua...

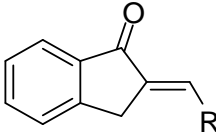
GSQ17	3,4-diCl-fenil	si	17,58 ± 4,38	12,71 ± 0,02
GSQ19	4-CF ₃ -fenil	si	9,90 ± 3,26	20,33 ± 0,16
GSQ20	3,5-diCl-fenil	si	16,11 ± 7,09	6,61 ± 1,73
GSQ22	2,4-diCl-fenil	8,43 ± 5,38	si	12,29 ± 0,44
GSQ24	3,4-metilenodióxi-fenil	si	13,32 ± 5,32	6,84 ± 3,11
GSQ30		si	1,75 ± 2,61	49,84 ± 9,48
GSQ32	2-naftil	si	si	2,81 ± 1,21
GSQ33		39,37 ± 6,82	7,51 ± 7,92	18,44 ± 5,68
GSQ39		34,08 ± 4,44	4,37 ± 1,29	22,52 ± 1,49



Benzosuberonas	R	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA*	Inibição % da PtpB*
GSQ51	4-Cl-fenil	8,20 ± 7,29	si	si
GSQ52	4-OCH ₃ -fenil	3,93 ± 5,05	si	si
GSQ53	4-butóxi-fenil	13,85 ± 5,50	1,08 ± 8,91	si
GSQ54	3-Br-fenil	0,52 ± 4,48	6,06 ± 1,66	si
GSQ56	4-CH ₃ -fenil	8,91 ± 7,93	si	si
GSQ57	4-F-fenil	si	si	si
GSQ58	3-NO ₂ -fenil	si	5,01 ± 3,33	si
GSQ59	4-NO ₂ -fenil	si	7,25 ± 3,73	si
GSQ60	4-N(CH ₃) ₂ -fenil	46,35 ± 5,86	12,34 ± 3,15	si

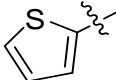
Continua...

Continua...

GSQ61	fenil	si	7,25 ± 8,78	si
				
Indanonas	R	Inibição (%) da YopH	Inibição % da PtpA*	Inibição % da PtpB*
GSQ151	fenil	2,41 ± 10,00	si	16,23 ± 7,98
GSQ152	4-NO ₂ -fenil	77,62 ± 3,22	48,83 ± 1,47	50,07 ± 3,42
GSQ153	4-Cl-fenil	9,61 ± 8,72	si	5,56 ± 2,63
GSQ154	4-N(CH ₃) ₂ -fenil	si	0,84 ± 6,09	3,58 ± 5,15
GSQ155	4-OCH ₃ -fenil	si	1,04 ± 2,47	si
GSQ156	4-CH ₃ -fenil	si	11,72 ± 16,80	si
GSQ157	3-NO ₂ -fenil	72,84 ± 0,30	34,91 ± 9,11	48,10 ± 14,84
GSQ158	3,4-diCl-fenil	80,74 ± 2,01	23,36 ± 2,17	45,30 ± 2,10
GSQ159	3-Cl-fenil	66,58 ± 4,38	25,36 ± 4,56	47,90 ± 9,81
GSQ160	4-Br-fenil	42,38 ± 2,17	18,62 ± 15,42	9,15 ± 26,18
GSQ161	4-F-fenil	10,63 ± 5,79	si	si
GSQ162	4-CF ₃ -fenil	47,75 ± 4,26	13,37 ± 4,36	12,93 ± 6,79
GSQ163	3-CF ₃ -fenil	41,65 ± 6,66	18,98 ± 10,08	9,71 ± 12,39
GSQ164	3-Br-fenil	5,59 ± 6,15	15,61 ± 10,26	si
GSQ165	4-butóxi-fenil	si	7,68 ± 16,28	si
GSQ166	2,6-diOCH ₃ -fenil	36,12 ± 7,79	16,2 ± 7,45	si
GSQ167	3,4-diOCH ₃ -fenil	2,67 ± 15,70	4,34 ± 1,52	si
GSQ168	2,5-diOCH ₃ -fenil	16,79 ± 4,08	si	si

Continua...

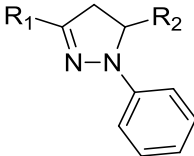
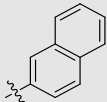
Continua...

GSQ169	3,4-diCl fenil	73,18 ± 5,41	26,54 ± 1,00	7,50 ± 14,58
GSQ170	1-naftil	39,10 ± 4,28	6,82 ± 1,37	si
GSQ171	2-naftil	26,21 ± 0,31	17,38 ± 10,14	si
GSQ172		20,25 ± 3,87	4,42 ± 0,64	si

* Dados pertencentes à tese de Doutorado de Angela C. O. Menegatti ; si = Sem inibição; valores destacados: compostos que apresentaram inibição da atividade da YopH superior a 50%, considerando o desvio.

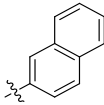
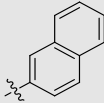
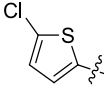
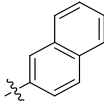
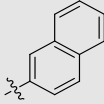
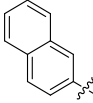
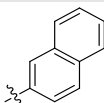
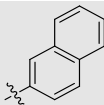
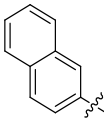
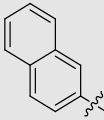
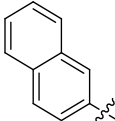
Outra abordagem feita com relação à síntese de novos compostos foi gerar pirazolinas (análogos cíclicos) a partir das chalconas que apresentaram atividade inibitória das fosfatases PtpA, PtpB e YopH previamente descritas por nosso grupo (CHIARADIA et al., 2008; MASCARELLO et al., 2010; CHIARADIA et al., 2012; MARTINS et al., 2013). Essa abordagem originou 25 pirazolinas, cujas estruturas e capacidade inibitória são apresentadas na tabela 5. Destas, 8 possuem inibição da atividade da YopH superior a 50%. Na literatura, são descritas pirazolinas com atividade antitubercular (VYAS et al., 2007), antibacteriana e antifúngica (HASSAN, 2013).

Tabela 5. Pirazolinas com seus respectivos resultados de inibição das enzimas YopH, PtpA e PtpB.

					
Pirazolinas	R1	R2	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA*	Inibição % da PtpB*
Ea1	2,5-diOCH ₃ - fenil		si	si	3,88 ± 11,81

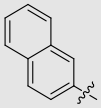
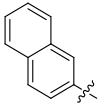
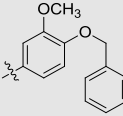
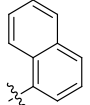
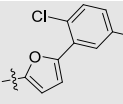
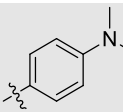
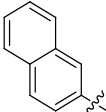
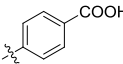
Continua...

Continua...

Ea2	3-OCH ₃ 4-OH-fenil		54,33 ± 0,35	31,13 ± 11,35	41,19 ± 4,42
Ea3	3,4-diOCH ₃ -fenil		87,03 ± 1,14	59,55 ± 6,41	68,09 ± 3,08
Ea4			30,45 ± 3,27	25,68 ± 12,09	59,17 ± 3,66
Ea5	4-Br-fenil		59,96 ± 6,80	si	54,05 ± 0,57
Ea6			79,05 ± 5,83	34,90 ± 10,56	64,79 ± 1,29
Ea7	3-NO ₂ -fenil	3,4-metilenodi óxi- fenil	30,49 ± 4,41	si	44,71 ± 4,26
Ea8	3-NO ₂ -fenil	3,4-metilenodi óxi- fenil	30,68 ± 5,45	15,98 ± 13,46	22,71 ± 0,47
Ea9	3,4,5-triOCH ₃ -fenil		51,87 ± 6,04	14,41 ± 10,19	41,78 ± 3,44
Ea10		3-NO ₂ -fenil	60,31 ± 5,64	46,04 ± 3,87	63,12 ± 3,23
Ea11		3-CF ₃ -fenil	32,50 ± 8,79	7,93 ± 9,08	23,14 ± 7,09
Ea12		3-Cl-fenil	29,36 ± 2,93	6,99 ± 7,38	27,97 ± 2,75

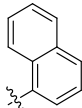
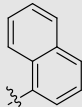
Continua...

Continua...

Ea13		fenil	40,22 ± 6,88	19,08 ± 14,62	23,61 ± 8,99
Ea14		3-CF ₃ 4-Cl-fenil	36,02 ± 1,44	13,50 ± 10,60	25,60 ± 10,15
Ea15	2,4-diOCH ₃ fenil		10,10 ± 3,97	5,44 ± 12,03	20,37 ± 6,13
Ea16	2,5-diOCH ₃ fenil		70,10 ± 7,09	43,47 ± 0,83	58,37 ± 8,80
Ea17	3,4-metilenodió xi fenil		36,47 ± 2,26	35,06 ± 3,91	45,90 ± 4,12
Ea18	2,4-diOCH ₃ 5-OH fenil	2-NO ₂ -fenil	29,31 ± 7,91	23,82 ± 1,69	11,31 ± 4,76
Ea19	3,4,5-triOCH ₃ fenil		si	17,20 ± 3,01	12,22 ± 11,30
Ea20			30,72 ± 6,57	61,43 ± 0,91	11,50 ± 10,92
Ea21	3,4-metilenodió xi fenil	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	si	17,96 ± 2,48	13,28 ± 5,37
Ea22	3,4,5-triOCH ₃ fenil	3,4-metilenodió xi-fenil	si	17,48 ± 1,37	si
Ea23	3,4-metilenodió xi fenil	2,3,4-triOCH ₃ -fenil	10,00 ± 2,95	14,90 ± 0,63	6,60 ± 7,80

Continua...

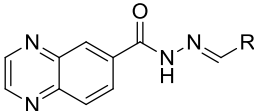
Continua...

Ea24	3-OH fenil		53,83 ± 5,63	30,98 ± 8,13	26,34 ± 8,86
Ea25	3,4,5-triOCH ₃ fenil		15,22 ± 2,10	16,84 ± 3,50	17,26 ± 7,33

* Dados pertencentes à tese de Doutorado de Deise J. Kolling; si = Sem inibição; valores destacados: compostos que apresentaram inibição da atividade da YopH superior a 50%, considerando o desvio.

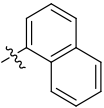
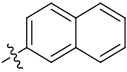
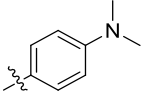
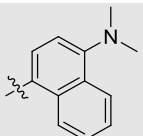
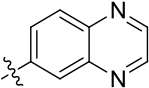
Hidrazona é uma classe química que possui muitos exemplos de compostos bioativos, com uma ampla aplicação farmacológica. Elas apresentam um grupo azometino ($-\text{NHN}=\text{CH}$), o qual é considerado um derivado de cetonas e aldeídos pela substituição do oxigênio pelo $=\text{NNH}_2$ (ASIF e HUSAIN, 2013). Entre as atividades descritas para derivados de hidrazonas encontram-se: inibidores da formação de placa amiloide (TÖRÖK et al., 2013), inibidores da atividade da ribonuclease H da transcriptase reversa do HIV-1 (ARION et al., 2002) e atividade antitubercular (BEDIA et al., 2006; MORE et al., 2014). Na tabela 6 são mostrados os valores de inibição e as estruturas das hidrazonas testadas neste trabalho. Das 46 hidrazonas, somente uma (HQ16) apresentou inibição da atividade da YopH superior a 50 %.

Tabela 6. Hidrazonas com seus respectivos resultados de inibição das enzimas YopH, PtpA e PtpB.

				
Hidrazonas	R	Inibição% da YopH	Inibição% da PtpA	Inibição% da PtpB
HQ1	4-OCH ₃ -fenil	7,07 ± 1,53	16,40 ± 20,61	14,53 ± 18,60
HQ2	fenil	si	8,73 ± 3,46	30,91 ± 18,14
HQ3	4-Cl-fenil	2,92 ± 11,27	10,81 ± 1,83	17,10 ± 8,56

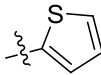
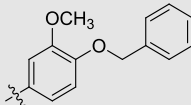
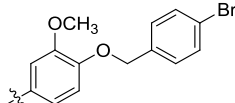
Continua...

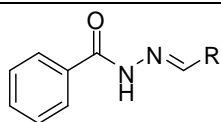
Continua...

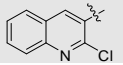
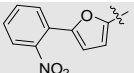
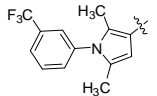
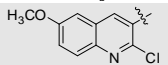
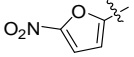
HQ4		9,22 ± 14,30	13,59 ± 8,64	12,50 ± 16,64
HQ5	2,5-diOCH ₃ -fenil	11,73 ± 23,99	9,95 ± 0,70	4,32 ± 10,01
HQ6		si	si	14,25 ± 9,89
HQ7	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	5,50 ± 6,95	10,23 ± 4,57	17,36 ± 22,35
HQ8	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	si	si	3,41 ± 16,10
HQ9	3-OCH ₃ 4-OH-fenil	4,11 ± 14,33	8,30 ± 1,18	20,12 ± 12,01
HQ10		8,99 ± 10,07	7,03 ± 1,71	14,05 ± 22,65
HQ11	4-Br-fenil	6,60 ± 0,51	10,98 ± 0,14	37,52 ± 18,00
HQ12	3,4-metilenodióxi-fenil	1,88 ± 6,28	3,50 ± 7,69	si
HQ13		8,81 ± 5,91	14,39 ± 0,92	si
HQ14		3,58 ± 5,83	11,19 ± 1,31	5,00 ± 29,21
HQ15	4-NO ₂ -fenil	si	11,35 ± 1,87	1,81 ± 35,03
HQ16	3,4-diCl-fenil	63,52 ± 9,57	46,16 ± 0,77	33,51 ± 20,74
HQ17	4-CH ₃ -fenil	si	11,64 ± 0,28	3,71 ± 29,98
HQ18	2,3,4-triOCH ₃ -fenil	7,65 ± 4,38	10,51 ± 0,25	0,25 ± 31,86
HQ19	3,4-diOCH ₃ -fenil	13,74 ± 12,42	20,24 ± 16,21	si

Continua...

Continua...

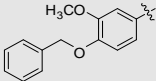
HQ20		$12,82 \pm 14,47$	$11,79 \pm 5,21$	$15,62 \pm 28,33$
HQ21		$14,82 \pm 5,95$	$19,61 \pm 5,47$	$16,89 \pm 17,44$
HQ22		$20,06 \pm 9,74$	$7,67 \pm 0,87$	$31,55 \pm 2,46$



Hidrazonas	R	Inibição (%) da YopH	Inibição (%) da PtpA*	Inibição (%) da PtpB*
G1		si	$9,48 \pm 3,40$	$11,14 \pm 2,38$
G2	2-tiofeno	si	si	$22,26 \pm 2,88$
G3		si	si	$0,90 \pm 2,38$
G4		si	si	$7,95 \pm 2,96$
G5		si	$4,42 \pm 5,33$	$28,45 \pm 6,11$
G6		si	$4,08 \pm 0,63$	$27,94 \pm 6,61$
G7	3-NO ₂ ,4-OH-fenil	si	$1,36 \pm 2,82$	$21,22 \pm 4,10$
G8	3-piridina	$5,79 \pm 3,13$	$2,47 \pm 2,84$	>100
G9	3,5-diOCH ₃ ,4-OH-fenil	si	si	$22,32 \pm 3,40$
G10	4-piridina	si	si	$9,46 \pm 4,49$

Continua...

Continua...

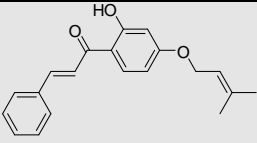
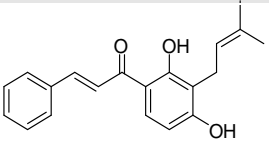
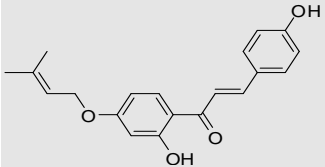
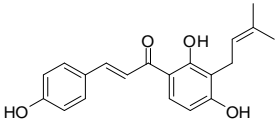
G11		si	22,14 ± 1,30	16,79 ± 3,07
G12	3,4-diOCH ₃ -fenil	si	11,56 ± 0,96	si
G13	fenil	si	5,32 ± 0,01	10,70 ± 8,48
G14	2-CN-fenil	si	10,46 ± 6,26	17,27 ± 5,18
G15	3-CN-fenil	si	23,65 ± 7,33	8,19 ± 0,51
G16	4-CN-fenil	si	17,10 ± 4,01	25,38 ± 3,40
G17	3,4- metilenodióxi-fenil	si	20,21 ± 8,87	14,30 ± 3,96
G18	2-NO ₂ -fenil	9,08 ± 6,24	24,26 ± 2,69	si
G19	4-Br-fenil	2,45 ± 6,02	17,31 ± 0,47	si
G20	4-CH ₃ -fenil	1,49 ± 7,49	25,57 ± 5,16	13,68 ± 8,66
G21	1-naftil	4,18 ± 7,76	7,90 ± 2,06	43,21 ± 6,32
G22	2-naftil	0,28 ± 8,76	9,26 ± 3,16	40,42 ± 7,55
G23	2-OH,5-Br-fenil	9,57 ± 4,16	si	25,85 ± 4,06
G24	4- CF ₃ -fenil	si	si	20,66 ± 3,10

si = Sem inibição; valores destacados: compostos que apresentaram inibição da atividade da YopH superior a 50%, considerando o desvio.

Na literatura há muitos compostos derivados de plantas, algas e micro-organismos com ação inibitória de enzimas, incluindo as PTP. Apesar de apresentarem normalmente baixa estabilidade, o que é um fator limitante para seu uso, estes compostos podem atuar em baixas concentrações e servirem como ponto de partida para a síntese de análogos (FERREIRA et al., 2006). Há relatos dos hexapeptídeos brunsvicamidas B e C (MÜLLER et al., 2006), ascocitina (SEIBERT et al., 2006) e asperterpenóide A (HUANG et al., 2013) como inibidores

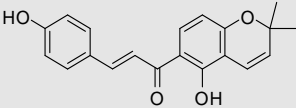
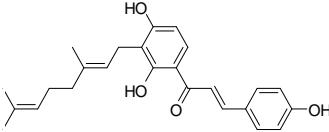
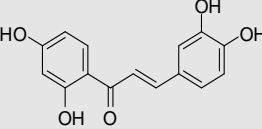
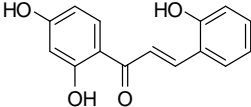
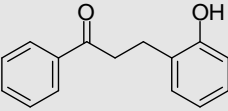
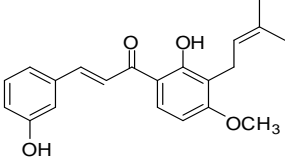
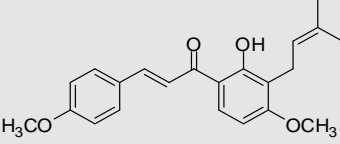
da PtpB de Mtb. Recentemente nosso grupo de pesquisa relatou a atividade de um composto natural isolado da *Morus nigra* (Kuwanol E) com ótima atividade inibitória da PtpB, o qual apresentou valor de K_i de $1,6 \mu\text{M}$ (MASCARELLO et al., 2013). Como inibidores da YopH, encontram-se pseudoceramina B (IC_{50} $33 \mu\text{M}$) e espermatinamina (IC_{50} $6 \mu\text{M}$) (YIN et al., 2011). Buscando novas moléculas naturais com capacidade inibitória das PTP, neste trabalho testou-se 42 compostos de diferentes fontes naturais. Destes, 15 apresentaram inibição da atividade da YopH superior a 50%. Os resultados de inibição obtidos para YopH, PtpA e PtpB são mostrados na tabela 7.

Tabela 7. Compostos naturais com seus respectivos resultados de inibição das enzimas YopH, PtpA e PtpB.

Compostos naturais	Estrutura	Inibição (%) da YopH	Inibição (%) da PtpA*	Inibição (%) da PtpB*
CH1		$74,09 \pm 1,36$	$18,91 \pm 3,22$	si
CH2		$75,32 \pm 2,33$	$26,65 \pm 5,90$	$3,07 \pm 8,07$
CH3		$64,11 \pm 2,48$	$35,45 \pm 2,17$	$28,31 \pm 14,94$
CH4		$24,32 \pm 5,43$	$48,46 \pm 1,62$	$15,96 \pm 3,09$

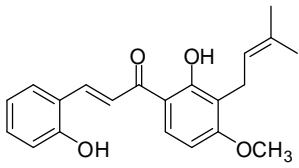
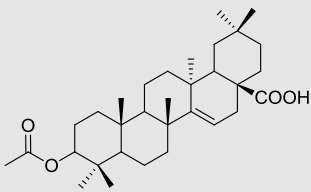
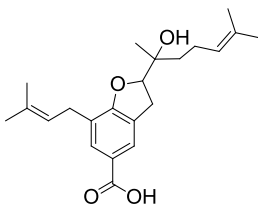
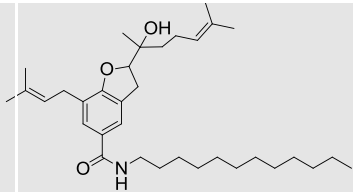
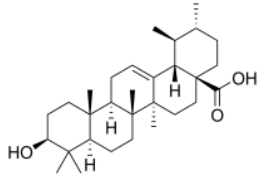
Continua...

Continua...

CH5		$52,90 \pm 5,39$	$35,15 \pm 2,49$	$47,66 \pm 1,46$
CH6		nd	$98,71 \pm 0,01$	$42,62 \pm 5,81$
CH7		$41,36 \pm 3,11$	$19,54 \pm 0,56$	si
CH8		si	$23,40 \pm 0,19$	si
CH9		$18,09 \pm 1,48$	$15,98 \pm 0,23$	si
CH10		$48,60 \pm 2,96$	$33,92 \pm 1,00$	$5,34 \pm 13,88$
CH11		$56,41 \pm 4,35$	$24,62 \pm 2,84$	si

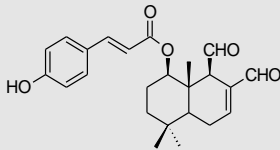
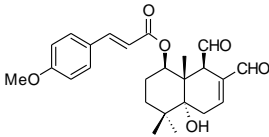
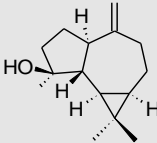
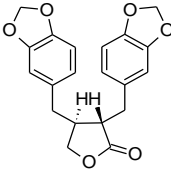
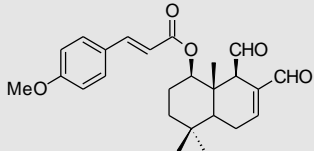
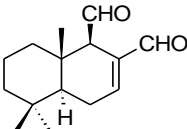
Continua...

Continua...

CH12		$46,43 \pm 3,31$	$33,67 \pm 1,86$	si
Ácido Acetil Aleurítico (AAA)		90,18 ± 4,28	$53,20 \pm 13,91$	$58,75 \pm 16,80$
Ácido Mirsinoico B (119-148)		$31,30 \pm 6,74$	$2,71 \pm 11,88$	si
Ácido Mirsinoico B 12C		$31,50 \pm 7,26$	$4,65 \pm 18,84$	$13,53 \pm 5,94$
Ácido Ursólico		$33,65 \pm 4,43$	$20,26 \pm 10,08$	$8,10 \pm 8,05$

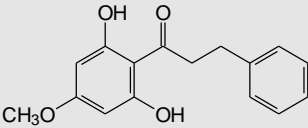
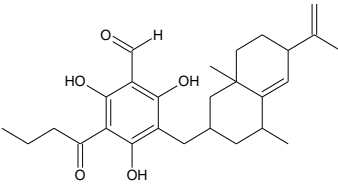
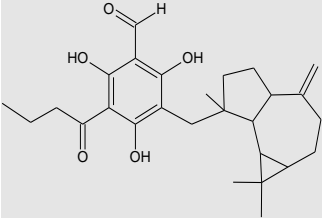
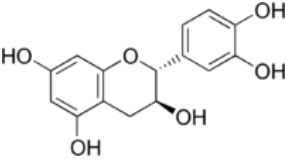
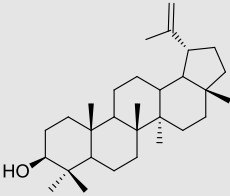
Continua...

Continua...

<i>Drimys brasiliensis</i> 1-β-(p- cumaróilxi)- poligodial		si	2,64 ± 12,12	5,36 ± 15,51
<i>Drimys brasiliensis</i> Drimanial		si	si	8,93 ± 4,08
<i>Drimys brasiliensis</i> Espatulanol		si	si	7,83 ± 12,36
<i>Drimys brasiliensis</i> Hinoquinina		si	6,66 ± 2,59	6,35 ± 12,35
<i>Drimys brasiliensis</i> 1-β-(p- metoxicinamil)- poligodial		5,69 ± 8,89	16,00 ± 5,49	10,74 ± 2,52
<i>Drimys brasiliensis</i> Poligodial		si	16,28 ± 1,98	15,76 ± 1,08

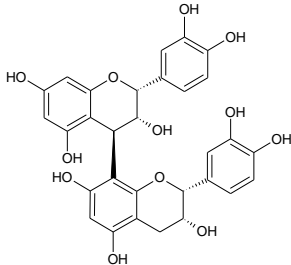
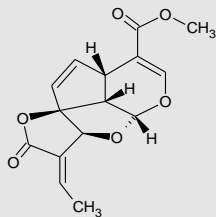
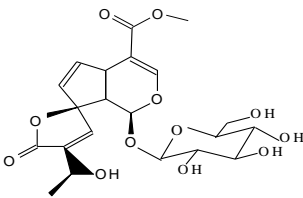
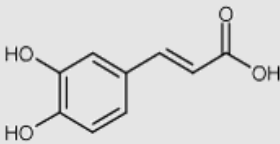
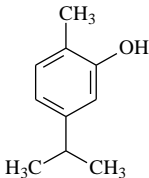
Continua...

Continua...

Diidrochalcona <i>Piper</i> sp.		si	6,29 ± 0,71	si
<i>Eugenia umbelliflora</i> fração 163 (EUFRI63)		97,09 ± 0,31	94,68 ± 1,63	97,03 ± 0,92
<i>Eugenia umbelliflora</i> fração 592 (EUFRI592)		96,19 ± 2,11	94,88 ± 1,54	97,01 ± 0,97
<i>Litchia chinensis</i> epicatequina 198		si	6,81 ± 8,22	9,85 ± 1,06
Lupeol		87,23 ± 3,88	42,59 ± 11,97	58,91 ± 3,16

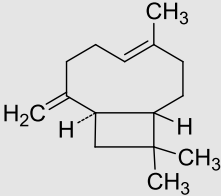
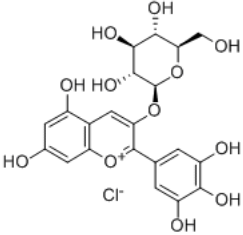
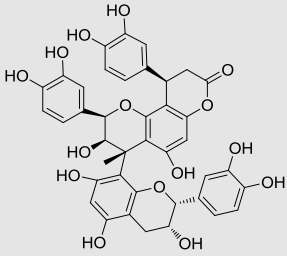
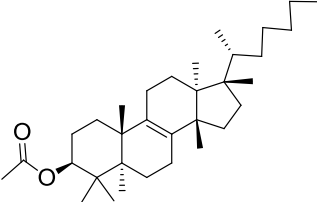
Continua...

Continua...

<i>Litchia chinensis</i> procianidina B2 59		$27,64 \pm 3,85$	$62,68 \pm 7,60$	$31,91 \pm 2,80$
Plumericina		si	$2,29 \pm 7,03$	$16,19 \pm 0,24$
Plumierideo		si	$15,37 \pm 2,41$	$5,15 \pm 2,41$
Ácido cafeico		$22,24 \pm 2,73$	$24,04 \pm 7,81$	si
Carvacrol		si	si	si

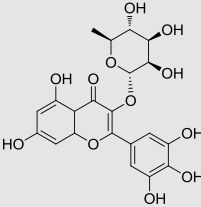
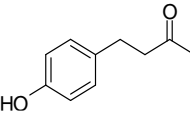
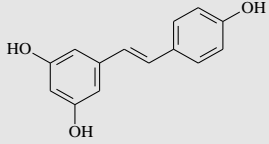
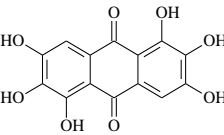
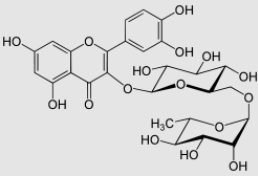
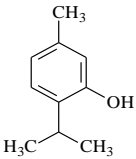
Continua...

Continua...

Cariofileno		$26,75 \pm 4,04$	$15,96 \pm 20,66$	$0,13 \pm 0,64$
Delfinidina		$97,81 \pm 0,78$	$94,06 \pm 0,46$	$86,13 \pm 0,84$
Cinchonaina IIb		$47,15 \pm 10,38$	$66,03 \pm 2,21$	$21,41 \pm 4,56$
Acetato de eufol		$44,60 \pm 8,74$	si	$51,33 \pm 1,49$

Continua...

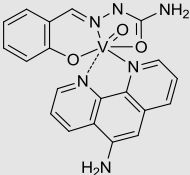
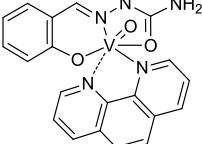
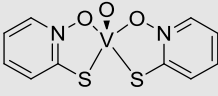
Continua...

Miricetrina		48,12 ± 8,16	40,98 ± 16,83	13,84 ± 23,60
Cetona de framboesa		si	16,15 ± 12,47	si
Resveratrol		si	1,72 ± 3,99	31,97 ± 1,13
Rufigallol		81,14 ± 2,04	32,92 ± 1,88	33,43 ± 0,32
Rutina		24,87 ± 5,74	23,43 ± 23,41	9,62 ± 3,02
Timol		9,18 ± 0,06	si	41,51 ± 4,86

* Dados pertencentes à tese de Doutorado de Angela C. O. Menegatti ; si = Sem inibição; valores destacados: compostos que apresentaram inibição da atividade da YopH superior a 50%, considerando o desvio.

Desde a década de 80 é descrito na literatura a capacidade de inibição de PTP por compostos contendo vanádio em sua estrutura (SWARUP et al., 1982). O ortovanadato de sódio, por exemplo, é um inibidor geral de fosfatases (GORDON, 1991) e é comercializado por empresas de biotecnologia. Devido à atividade inibitória de PTP, os compostos contendo vanádio representam uma boa perspectiva a ser explorada para a descoberta de novos inibidores. No presente trabalho foram testados 3 complexos de vanádio, sendo que todos apresentaram excelente inibição da PtpA, PtpB e YopH nos ensaios de triagem. A estrutura de cada complexo e os valores obtidos para inibição das fosfatases são apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Complexos de vanádio, suas estruturas e seus respectivos resultados de inibição das enzimas YopH, PtpA e PtpB

Complexos de vanádio	Estrutura	Inibição % da YopH	Inibição % da PtpA	Inibição % da PtpB
1		99,61 ± 0,08	98,40 ± 0,13	88,86 ± 2,65
2		99,51 ± 0,01	63,17 ± 5,81	85,41 ± 0,99
3		99,48 ± 0,12	77,67 ± 11,9	54,80 ± 9,59

valores destacados: compostos que apresentaram inibição da atividade da YopH superior a 50%, considerando o desvio.

A partir dos resultados obtidos nos testes de triagem (tabelas 2 a 8), selecionou-se 100 compostos com atividade inibitória da YopH superior a 50%, quando comparados ao controle positivo (YopH com 5% de DMSO), para dar continuidade com ensaios de IC₅₀. Na tabela 9 são apresentados os 100 compostos com suas respectivas porcentagens de inibição frente à YopH.

Tabela 9. Compostos selecionados para prosseguir com os ensaios de IC₅₀ com suas respectivas porcentagens de inibição da atividade da YopH.

Composto	Inibição (%) da YopH Média ± Desvio padrão	Composto	Inibição (%) da YopH Média ± Desvio padrão
BC2	33,87 ± 19,15	Py6	62,30 ± 10,20
BC6	52,52 ± 8,22	Py10	79,25 ± 3,54
BC7	80,07 ± 11,39	Py11	91,78 ± 0,49
BC8	73,59 ± 9,84	Py12	53,59 ± 4,44
BC10	80,80 ± 3,06	Complexo de vanádio 1	99,61 ± 0,08
BC11	76,76 ± 5,07	Complexo de vanádio 2	99,51 ± 0,01
BC14	46,30 ± 3,84	Complexo de vanádio 3	99,48 ± 0,12
BC17	59,15 ± 4,21	CH1	74,09 ± 1,36
BC18	78,44 ± 3,81	CH2	75,32 ± 2,33
BC19	91,43 ± 1,89	CH3	64,11 ± 2,48
BC20	42,71 ± 22,70	CH5	52,90 ± 5,39
PM1	97,63 ± 0,55	CH6	*
PM6	82,96 ± 4,66	CH10	48,60 ± 2,96
PM8	91,07 ± 4,44	CH11	56,41 ± 4,35
PM10	51,85 ± 16,11	AAA	90,18 ± 4,28
PM11	93,34 ± 3,02	EUFR163	97,09 ± 0,31
PM15	46,92 ± 13,68	EUFR592	96,19 ± 2,11
AN1	55,39 ± 1,07	Lupeol	87,23 ± 3,88
AN2	64,41 ± 3,34	Delfinidina	97,81 ± 0,78
AN4	50,59 ± 0,56	Cinchonaina IIb	47,15 ± 10,38
AN6	50,05 ± 4,07	Acetato de eufol	44,60 ± 8,74
AN7	74,02 ± 11,80	Miricetrina	48,12 ± 8,16
AN8	63,19 ± 8,21	Rufigallol	81,14 ± 2,04
AN9	57,90 ± 5,18	Ea2	54,33 ± 0,35
AN10	58,31 ± 1,05	Ea3	87,03 ± 1,14
AN11	56,50 ± 0,74	Ea5	59,96 ± 6,80
AN12	56,33 ± 6,88	Ea6	79,05 ± 5,83
AN15	65,90 ± 7,47	Ea9	51,87 ± 6,04
JA1	62,32 ± 20,85	Ea10	60,31 ± 5,64
JA2	93,64 ± 5,82	Ea16	70,10 ± 7,09
JA3	41,24 ± 15,05	Ea24	53,83 ± 5,63
JA5	44,01 ± 9,18	B65	46,51 ± 21,07
JA6	52,20 ± 10,39	B66	43,93 ± 23,34

Continua...

Continua...			
JA10	96,36 ± 2,90	B75	57,28 ± 11,38
JEKP	88,12 ± 8,28	B78	84,25 ± 10,55
JE2	98,56 ± 0,44	B85	93,31 ± 2,10
JE5	86,31 ± 7,92	H6	87,28 ± 2,32
JE7	65,34 ± 1,23	H22	85,46 ± 3,45
JE9	66,10 ± 3,12	HB8	94,56 ± 1,02
JE10	55,76 ± 35,62	HB9	49,07 ± 7,82
JE15	95,65 ± 2,66	HB15	40,88 ± 13,54
KP1	57,58 ± 1,01	GSQ-60	46,35 ± 5,86
KP2	89,49 ± 0,88	GSQ-152	77,62 ± 3,22
KP10	49,98 ± 12,22	GSQ-157	72,84 ± 0,30
KP12	50,82 ± 5,22	GSQ-158	80,74 ± 2,01
KP13	51,42 ± 3,83	GSQ-159	66,58 ± 4,38
N7	68,62 ± 13,51	GSQ-162	47,75 ± 4,26
Py1	96,01 ± 0,18	GSQ-169	73,18 ± 5,41
Py3	73,01 ± 2,11	HQ16	63,52 ± 9,57
Py4	60,20 ± 0,47	DFS8	55,36 ± 3,01

* O composto CH6 apresentou boa inibição frente às enzimas PtpA e PtpB de Mtb. Por não termos grande quantidade do composto, decidimos realizar diretamente o teste de IC₅₀ deste em YopH.

2.3.3 Determinação da IC₅₀ dos compostos promissores

Nos ensaios de IC₅₀ 10 concentrações distintas dos compostos foram avaliadas frente a 13 nM final de YopH recombinante. Inicialmente testou-se uma faixa de concentração de 5 a 100 µM de cada composto. Para aqueles compostos cujos valores de IC₅₀ ficaram abaixo de 5 µM, uma nova faixa foi estabelecida, de maneira que os valores de IC₅₀ determinados não fossem calculados a partir de extrapolação de dados.

Dos 100 compostos selecionados para realização dos ensaios de IC₅₀, 64 são chalconas sintéticas, 16 são compostos naturais, 8 são pirazolinias, 6 são indadonas, 1 é benzosuberona, 1 hidrazona, 1 sulfonamida e 3 complexos de vanádio.

Os resultados obtidos indicam:

- 2 compostos com modesta inibição da YopH ($IC_{50} > 75 \mu M$): BC7 e GSQ-60.
- 26 compostos com moderada inibição ($60 \mu M > IC_{50} > 25 \mu M$): BC14, AN1, AN2, AN6, AN12, JA3, JA6, KP1, KP12, KP13, N7, CH1, CH5, Cinchonina Iib, Acetato de eufol, Miricetrina, Rufigalol, Ea5, Ea9, H6, HB9, HB15, GSQ-157, GSQ-158, GSQ-162 e GSQ-169.
- 40 compostos com inibição considerável ($25 \mu M > IC_{50} > 10 \mu M$): BC2, BC6, BC20, PM10, PM15, AN4, AN7, AN8, AN9, AN10, AN11, AN15, JA1, JA2, JA5, JEKP, JE5, JE7, JE9, JE10, KP10, PY3, PY4, PY6, PY10, PY12, CH2, CH3, CH10, CH11 Ea2, Ea6, Ea10, Ea24, B66, H22, HB8, GSQ-152, GSQ-159 e HQ16
- 28 compostos com boa inibição ($10 \mu M > IC_{50} > 1 \mu M$): BC8, BC10, BC11, BC17, BC18, BC19, PM1, PM6, PM8, PM11, JA10, JE02, JE15, KP2, PY1, PY11, CH6, AAA, EUFR163, EUFR592, Lupeol, Delfinidina, Ea3, Ea16, B65, B75, B78 e B85.
- 3 compostos com excelente inibição, com valores de IC_{50} inferiores a $0,3 \mu M$: complexo de vanádio 1, complexo de vanádio 2 e complexo de vanádio 3.

Não foi determinada a IC_{50} do DFS8 por ter pouca quantidade do composto para prosseguir com os testes. Na tabela 10 são mostrados os valores obtidos nestes ensaios.

Tabela 10. Resultados obtidos nos ensaios de IC_{50} com a enzima YopH.

Composto	$IC_{50} (\mu M)$ da YopH Média \pm Desvio padrão	Composto	$IC_{50} (\mu M)$ da YopH Média \pm Desvio padrão
BC2	$12,77 \pm 2,98$	Py6	$13,15 \pm 2,18$
BC6	$21,41 \pm 3,80$	Py10	$22,35 \pm 3,64$
BC7	> 100	Py11	$5,02 \pm 0,47$
BC8	$9,97 \pm 0,16$	Py12	$22,51 \pm 2,41$
BC10	$7,42 \pm 1,55$	Complexo de vanádio 1	$0,06 \pm 0,01$
BC11	$9,18 \pm 0,37$	Complexo de vanádio 2	$0,10 \pm 0,01$

Continua...

Continua...

BC14	45,11 ± 2,64	Complexo de vanádio 3	0,29 ± 0,01
BC17	6,44 ± 0,91	CH1	35,98 ± 1,00
BC18	6,01 ± 0,74	CH2	18,79 ± 1,20
BC19	3,24 ± 0,30	CH3	17,62 ± 2,67
BC20	20,43 ± 1,72	CH5	30,24 ± 3,94
PM1	2,96 ± 0,19	CH6	3,81 ± 0,23
PM6	6,97 ± 1,22	CH10	23,14 ± 1,69
PM8	5,02 ± 0,47	CH11	21,45 ± 0,52
PM10	20,62 ± 3,32	AAA	3,29 ± 0,78
PM11	5,47 ± 0,89	EUFR163	1,59 ± 0,34
PM15	22,86 ± 1,74	EUFR592	2,13 ± 0,29
AN1	26,58 ± 3,51	Lupeol	7,98 ± 0,55
AN2	28,04 ± 3,58	Delfinidina	2,58 ± 0,79
AN4	15,31 ± 4,46	Cinchonaina IIb	58,98 ± 4,21
AN6	27,75 ± 5,78	Acetato de eufol	30,89 ± 5,62
AN7	15,74 ± 1,47	Miricetrina	32,38 ± 4,33
AN8	11,70 ± 2,96	Rufigallol	26,08 ± 0,73
AN9	22,69 ± 2,04	Ea2	21,80 ± 3,90
AN10	21,74 ± 1,47	Ea3	8,80 ± 2,60
AN11	23,54 ± 2,90	Ea5	31,80 ± 1,56
AN12	35,05 ± 7,13	Ea6	13,10 ± 0,90
AN15	24,95 ± 4,38	Ea9	28,20 ± 2,70
JA1	22,99 ± 4,87	Ea10	17,20 ± 0,90
JA2	14,53 ± 3,51	Ea16	8,90 ± 0,80
JA3	30,81 ± 5,34	Ea24	20,00 ± 3,30
JA5	19,20 ± 0,45	B65	8,26 ± 0,67
JA6	26,68 ± 1,14	B66	23,72 ± 3,90
JA10	4,27 ± 0,20	B75	2,47 ± 0,48
JEKP	16,47 ± 1,92	B78	2,28 ± 0,22
JE2	3,07 ± 0,80	B85	2,77 ± 0,33
JE5	12,16 ± 1,31	H6	46,97 ± 7,50
JE7	15,16 ± 1,04	H22	14,95 ± 1,27
JE9	16,44 ± 1,31	HB8	11,61 ± 0,91
JE10	24,26 ± 1,49	HB9	33,93 ± 6,47
JE15	6,18 ± 0,12	HB15	46,57 ± 4,53
KP1	25,45 ± 0,46	GSQ-60	78,03 ± 0,11
KP2	6,91 ± 1,18	GSQ-152	12,80 ± 0,50
KP10	19,28 ± 1,32	GSQ-157	26,44 ± 1,45
KP12	25,95 ± 1,80	GSQ-158	44,62 ± 2,56

Continua...

Continua...			
KP13	25,62 ± 3,83	GSQ-159	10,92 ± 0,99
N7	25,10 ± 3,70	GSQ-162	44,68 ± 2,33
Py1	3,97 ± 0,69	GSQ-169	25,51 ± 5,22
Py3	18,79 ± 2,96	HQ16	22,72 ± 1,10
Py4	19,29 ± 0,84	DFS8	nd

nd = não determinado

2.3.4 Estudos de Relação Estrutura-Atividade (REA)

A identificação de padrões estruturais necessários para a inibição da enzima em estudo é importante, pois, a partir destes padrões novas estruturas podem ser construídas com o intuito de aumentar a inibição e seletividade.

Para realizar os estudos de REA os compostos foram divididos em grupos, de modo que estruturas semelhantes pudessem ser comparadas e assim verificados os possíveis padrões estruturais que poderiam tornar uma molécula mais ativa do que outra. Os compostos foram divididos nos seguintes grupos:

- Grupo 1: série Ea (pirazolinas) e chalconas precursoras
- Grupo 2: séries AN, BC, JA, JE, KP, N, PM e PY (chalconas e bis-chalconas)
- Grupo 3: séries B, H, HB e GSQ (chalconas e chalconas heterocíclicas)
- Grupo 4: Complexos de vanádio

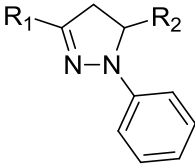
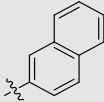
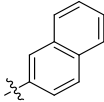
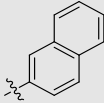
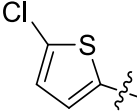
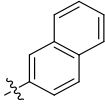
Optou-se por não discutir a REA dos compostos pertencentes às classes das sulfonamidas (séries DFS e GliA), sulfoniltiurêias (GliC) e hidrazonas (séries G e HQ), pois tiveram poucos representantes cujos valores de IC₅₀ foram determinados não sendo possível estabelecer uma REA adequada.

Os estudos de REA dos compostos naturais ainda estão em andamento, pois novos inibidores desta classe estão em teste.

2.3.4.1 Estudos de REA Grupo 1

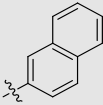
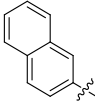
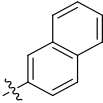
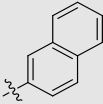
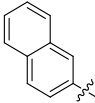
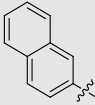
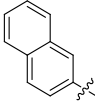
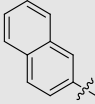
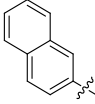
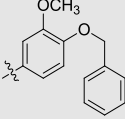
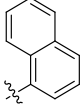
Pertencem ao grupo 1 os compostos da série Ea, que são pirazolinas e perfazem um total de 25 compostos. Para realizar os estudos de REA do grupo 1, foram determinados os valores de IC_{50} com todas as pirazolinas que apresentaram uma porcentagem de inibição da YopH superior ou igual a 30 % nos ensaios de triagem. As estruturas dos componentes desta série e seus respectivos resultados de IC_{50} estão representados na tabela 11. É importante esclarecer que as análises de REA do grupo 1 também são apresentadas na tese de Patrícia Devantier Neuenfeldt, doutoranda no Laboratório Estrutura e Atividade (LEAT-UFSC), que foi responsável pela síntese destas pirazolinas.

Tabela 11. Pirazolinas com seus respectivos resultados de IC_{50} obtidos para a YopH.

			
Pirazolininas	R1	R2	IC_{50} (μ M) da YopH Média \pm Desvio padrão da YopH
Ea1	2,5-diOCH ₃ -fenil		58,40 \pm 8,60
Ea2	3-OCH ₃ 4-OH-fenil		21,80 \pm 3,90
Ea3	3,4-diOCH ₃ -fenil		8,80 \pm 2,60
Ea4			27,30 \pm 0,80

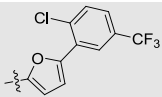
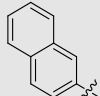
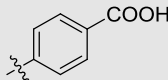


Continua...

Continua...

Ea5	4-Br-fenil		$31,80 \pm 1,56$
Ea6			$13,10 \pm 0,90$
Ea7	3-NO ₂ -fenil	3,4-metilenodióxi-fenil	$41,20 \pm 0,70$
Ea8	4-NO ₂ -fenil	3,4-metilenodióxi-fenil	$33,00 \pm 1,90$
Ea9	3,4,5-triOCH ₃ -fenil		$28,20 \pm 2,70$
Ea10		3-NO ₂ -fenil	$17,20 \pm 0,90$
Ea11		3-CF ₃ -fenil	$35,90 \pm 4,40$
Ea12		3-Cl-fenil	$53,70 \pm 2,40$
Ea13		fenil	$39,10 \pm 5,30$
Ea14		3-CF ₃ 4-Cl-fenil	$32,10 \pm 3,90$
Ea15	2,4-diOCH ₃ -fenil		$54,90 \pm 2,60$
Ea16	2,5-diOCH ₃ -fenil		$8,90 \pm 0,80$

Continua...

Continua...

Ea17	3,4-metilenodióxi-fenil		39,50 ± 0,70
Ea18	2,4-diOCH ₃ 5-OH-fenil	2-NO ₂ -fenil	49,80 ± 0,70
Ea20			36,80 ± 1,80
Ea21	3,4-metilenodióxi-fenil	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	na
Ea22	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	3,4-metilenodióxi-fenil	na
Ea23	3,4-metilenodióxi-fenil	2,3,4-triOCH ₃ -fenil	na
Ea24	3-OH-fenil		20,00 ± 3,30
Ea25	3,4,5-triOCH ₃ -fenil		> 100

na não ativo

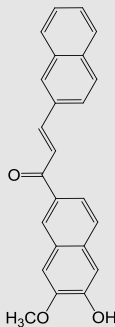
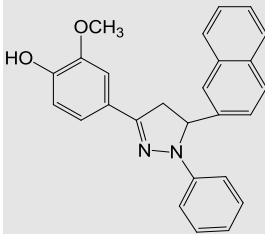
Quanto à análise dos padrões estruturais da série Ea, os dois compostos mais ativos (Ea3 e Ea16) possuem substituições dimetóxi no grupo fenil em R1 e apresentam o grupo naftil como R2. No caso do Ea3 o grupo fenil em R1 apresenta substituições por metóxi nas posições 3 e 4, e em R2 este composto apresenta o 2-naftil. Já no Ea16 as substituições por metóxi são nas posições 2 e 5 e R2 é o 1-naftil. O composto Ea25 que apresenta três substituições por grupos metóxi nas posições 3, 4 e 5 no grupo fenil em R1 diferente dos compostos disubstituídos Ea3 e Ea16, apresenta uma baixa atividade inibitória. Os compostos Ea16 e Ea1 apresentam estruturas muito semelhantes, a diferença entre os dois é que este último apresenta o substituinte 2-naftil. Apesar da estrutura semelhante de ambos o Ea16 mostrou um potencial inibitório de aproximadamente seis vezes e meia superior ao Ea1. Os compostos Ea12, Ea11 e Ea10 possuem o 2 naftil em R1 e grupos retiradores de elétrons na posição 3 do grupo fenil em R2. Aparentemente o grupo nitro nesta posição (Ea10) gera um composto cerca de duas vezes mais ativo do que o que apresenta CF₃ (Ea11) e três vezes mais ativo do que o composto que apresenta cloro (Ea12) nesta

mesma posição. Os compostos Ea7 e Ea8 possuem em R2 o grupo 3,4-metilenodióxi-fenil e uma substituição por nitro no grupo fenil em R1. Aparentemente se esta substituição estiver presente na posição 4 (Ea8) o composto tem maior capacidade inibitória do que se o mesmo apresentar esta substituição na posição 3 (Ea7). Compostos trissubstituídos por metóxi tanto em R1 (Ea22) quanto em R2 (Ea21) são inativos.

De maneira geral os compostos que possuem o grupo 2-naftil em R1 (Ea6 Ea10, Ea11, Ea12, Ea13, Ea14 e Ea20) ou R2 (Ea1, Ea2, Ea3, Ea4, Ea5 e Ea6), apresentam valores de IC_{50} que variam de 8,80 a 58,40 μM .

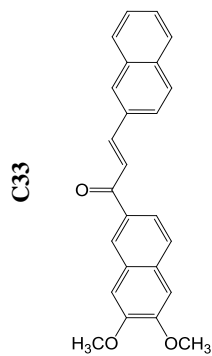
Alguns aspectos interessantes podem ser observados quando são comparadas as atividades inibitórias das pirazolininas mais ativas com as chalconas que serviram como base para construção das mesmas. A tabela 12 mostra a estrutura das chalconas precursoras e as suas pirazolininas com seus respectivos valores de IC_{50} .

Tabela 12. Estrutura das chalconas precursoras das pirazolininas em estudo

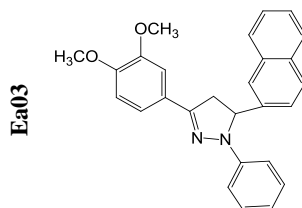
Chalcona	Estrutura	IC_{50} (μM) da YopH Média \pm Desvio padrão da YopH	Pirazolina	Estrutura	IC_{50} (μM) da YopH Média \pm Desvio padrão da YopH
C31		> 100	Ea02		21,80 \pm 3,90

Continua...

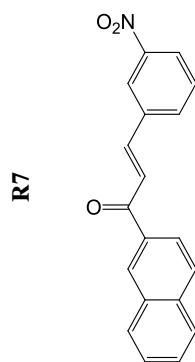
Continua...



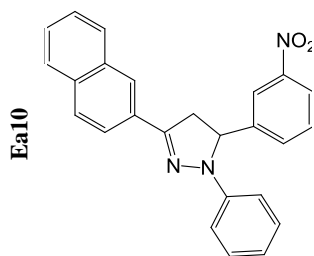
> 100

 $8,80 \pm 2,60$

R28	 <chem>O=C(C=Cc1ccc(cc1)c2ccccc2)c3ccccc3</chem>	$20,30 \pm 1,10$
Ea06	 <chem>O=C1C=NC2(C1)c3ccccc3C2c4ccc(cc4)c5ccccc5</chem>	$13,10 \pm 0,90$

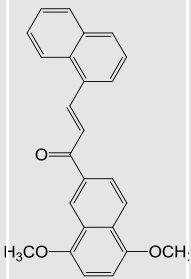
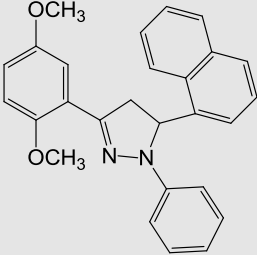
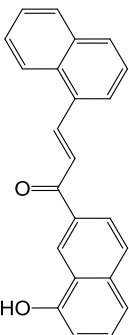
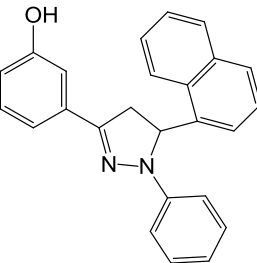


> 100

 $17,20 \pm 0,90$

Continua...

Continua...

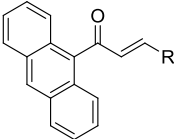


A1		$32,8 \pm 6,40$
Ea16		$8,90 \pm 0,80$
A16		> 100
Ea24		$20,00 \pm 3,30$

Algumas chalconas precursoras não tiveram atividade como inibidores de YopH (C31, C33, R7 e A16) enquanto seus derivados pirazolínicos apresentaram valores de IC_{50} inferiores a $25 \mu M$ (Ea2, Ea3, Ea10 e Ea24). As chalconas R28 e A1, que apresentaram atividade inibitória da enzima, também tiveram seus derivados pirazolínicos mais ativos do que as mesmas. No caso da A1, seu derivado pirazolínico (Ea16) apresenta uma potência inibitória quase quatro vezes maior. Estas observações levam a crer que a modificação de uma estrutura flexível e planar da chalcona para uma estrutura mais rígida como as pirazolinas, levam a uma melhor inibição da YopH.

2.3.4.2 Estudos de REA Grupo 2

O grupo 2 abrange as séries AN, BC, PM, JA, JE, KP, PY e N, perfazendo um total de 125 chalconas ou bis-chalconas, cujos representantes selecionados para análise de IC₅₀ mostraram valores que variaram de 2,96 µM a 45,11 µM. O estudo de REA foi feito analisando os componentes de cada série, bem como, entre as séries que apresentavam padrões estruturais semelhantes. Os valores de IC₅₀ e as estruturas dos compostos são apresentados nas tabelas 13 a 20.

Tabela 13. Chalconas série AN com seus respectivos resultados de IC₅₀ obtidos para a YopH.

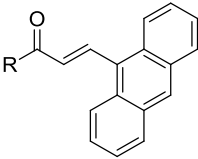
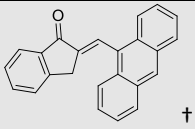
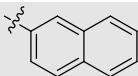
		
Chalconas	R	IC ₅₀ (µM) da YopH Média ± Desvio padrão da YopH
AN1		26,58 ± 3,51
AN2		28,04 ± 3,58
AN3	4-OCH ₃ -fenil	na
AN4	4-metil-fenil	15,31 ± 4,46
AN5	4-Cl-fenil	na
AN6	3,4-diCl-fenil	27,75 ± 5,78
AN7	3,4-metilenodióxi-fenil	15,74 ± 1,47
AN8	3-NO ₂ -fenil	11,70 ± 2,96
AN9	4-NO ₂ -fenil	22,69 ± 2,04
AN10	2,6-diOCH ₃ -fenil	21,74 ± 1,47
AN11	2,5-diOCH ₃ -fenil	23,54 ± 2,90
AN12	3,4-diOCH ₃ -fenil	35,05 ± 7,13
AN13	fenil	na
AN15	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	24,95 ± 4,38

na = não ativo

Ao analisar a série AN, pode-se sugerir as seguintes relações: aparentemente nos compostos AN8 e AN9 a posição no substituinte do

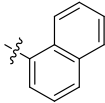
grupo nitro influencia na capacidade inibitória do composto, uma vez que a mudança deste grupo da posição 3 (AN8) para a posição 4 (AN9) do anel reduz praticamente pela metade a inibição enzimática. A monossubstituição do anel fenil na posição 4 por cloro (AN5) ou por metóxi (AN3) não são efetivas para a inibição da enzima, já a monossubstituição por nitro (AN9) leva a uma boa inibição, porém de intensidade inferior à monossubstituição por metil (AN4). Uma substituição adicional em 5 por metóxi no caso da AN15 é mais efetiva na inibição enzimática que somente a dissubstituição em 3 e 4 por metóxi (AN12), que apresenta praticamente a mesma inibição que AN10 (com dissubstituição por metóxi em 2 e 6) ou AN11 (com dissubstituição por metóxi em 2 e 5). Aparentemente a substituição do grupo 1-naftil por 2-naftil não influencia na potência de inibição (AN1 e AN2).

Tabela 14. Chalconas série KP com seus respectivos resultados de IC₅₀ obtidos para a YopH.

		
Chalcona	R	IC ₅₀ (μM) da YopH Média ± Desvio padrão da YopH
KP1		25,45 ± 0,46
KP2	4-NO ₂ -fenil	6,91 ± 1,18
KP3	3,4-diOCH ₃ -fenil	na
KP4	3,5-diOCH ₃ -fenil	na
KP5	2,4-diOCH ₃ -fenil	na
KP7	2,6-diOCH ₃ -fenil	na
KP8		na

Continua...

Continua...

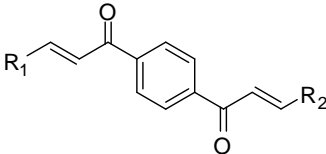
KP9		na
KP10	3-NO ₂ -fenil	19,28 ± 1,32
KP12	3-OH-4-OCH ₃ -fenil	25,95 ± 1,80
KP13	3,4-metilenodióxi-fenil	25,62 ± 3,83
KP14	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	na

† Representa a estrutura completa do composto;
na = não ativo

Apesar de somente 5 representantes da série KP terem seus valores de IC₅₀ determinados, algumas observações pontuais quanto às estruturas podem ser realizadas: a monosubstituição do fenil por nitro parece mais efetiva na posição 4 (KP2) do que na 3 (KP10), uma vez que a inibição é duas vezes e meia mais efetiva para o composto KP2 do que em KP10. A substituição da metoxila na posição 3 do composto KP3 (que não apresenta inibição da YopH) por uma hidroxila (KP12) leva a uma boa inibição.

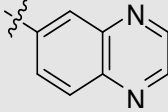
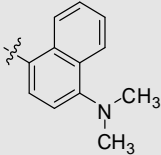
Ao comparar as séries AN e KP, verifica-se que a mudança do anel antraceno ligado à carbonila (série AN) para o carbono β (série KP) origina, de maneira geral, compostos menos ativos, quando são comparados os mesmos substituintes. Uma exceção observada é a do substituinte 4-NO₂-fenil, onde o composto KP2 é cerca de três vezes mais ativo que AN9.

Tabela 15. Bis-chalconas série BC com seus respectivos resultados de IC₅₀ obtidos para a YopH.

		
Bis-chalconas	R1 = R2	IC ₅₀ (μM) da YopH Média ± Desvio padrão da YopH
BC1	4-OCH ₃ -fenil	na
BC2	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	12,77 ± 2,98
BC4	3,4-diOCH ₃ -fenil	na
BC6	3,4-metilenodióxi-fenil	21,41 ± 3,80

Continua...

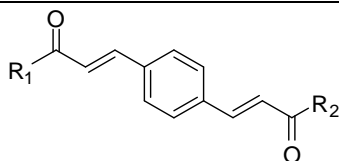
Continua...

BC7	2,5-diOCH ₃ -fenil	> 100
BC8	2-naftil	9,97 ± 0,16
BC10	1-naftil	7,42 ± 1,55
BC11	Fenil	9,18 ± 0,37
BC13	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	na
BC14	4-COOH-fenil	45,11 ± 2,64
BC15	2,4,6-triOCH ₃ -fenil	na
BC16	3-OCH ₃ ,4-OH-fenil	na
BC17		6,44 ± 0,91
BC18	4-N(CH ₃) ₂ -fenil	6,01 ± 0,74
BC19		3,24 ± 0,30
BC20	2,6-diOCH ₃ -fenil	20,43 ± 1,72
BC21	2,3,4-triOCH ₃ -fenil	na

na não ativo

Quanto à série BC, pode-se observar as seguintes relações: de maneira geral, substituições no grupo fenil geram compostos sem atividade (BC1, BC4, BC13, BC15, BC16, BC21) ou menos ativos (BC2, BC6, BC14, BC20) que o composto BC11, o qual não apresenta substituições no anel fenil. Uma exceção é a substituição 4-N(CH₃)₂, que origina um composto ligeiramente mais ativo (BC18) que BC11. A dissubstituição do anel fenil por metóxi provoca inibição quando este grupo está em 2 e 6 (BC20), porém, quando está em 3 e 4 (BC4) ou 2 e 5 (BC7) não há inibição da YopH. Entretanto, a substituição do anel fenil por anéis maiores, confere inibição semelhante (BC8, 2-naftil) ou ligeiramente melhor (BC10, 1-naftil e BC17, anel quinoxalina) em relação ao composto com o fenil não substituído (BC11). Esta inibição é potencializada quando há inserção de uma substituição N(CH₃)₂ em 4 no anel 1-naftil (BC19).

Tabela 16. Bis-chalconas série PM com seus respectivos resultados de IC₅₀ obtidos para a YopH.



Bis-chalconas	R1 = R2	IC ₅₀ (μM) da YopH Média ± Desvio padrão da YopH
PM1	4-OCH ₃ -fenil	2,96 ±0,19
PM2	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	na
PM3	3-OCH ₃ -fenil	na
PM4	3,4-diOCH ₃ -fenil	na
PM5	2,4-diOCH ₃ -fenil	na
PM6	3,4-metilenodióxi-fenil	6,97 ±1,22
PM7	2,5-diOCH ₃ -fenil	nd
PM8	2-naftil	5,02 ±0,47
PM9	3,5-diOCH ₃ -fenil	na
PM10	1-naftil	20,62 ±3,32
PM11	fenil	5,47 ±0,89
PM12	2-OCH ₃ -fenil	na
PM13	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	na
PM14	4-COOH-fenil	na
PM15	2,4,6-triOCH ₃ -fenil	22,86 ±1,74
PM16	3-OCH ₃ ,4-OH-fenil	na

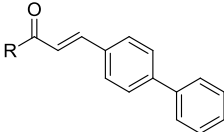
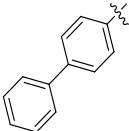
na = não ativo

Quanto à série PM, pode-se observar as seguintes relações: a troca do grupo 1-naftil (PM10) por 2-naftil (PM8) ou por fenil (PM11) leva a uma potencialização de quatro vezes na inibição da enzima. A substituição na posição 4 do anel fenil (PM11) por um grupo metóxi, doador de elétrons (PM1), aumenta em quase duas vezes a capacidade de inibição da enzima. No entanto, se a substituição na mesma posição for por carboxi (PM14), um grupo retirador de elétrons, o composto não apresenta inibição. Substituições por três grupos metoxi nas posições 3, 4 e 5 (PM2) e 2, 4 e 5 (PM13) do anel fenil geram compostos que não apresentam inibição, já nas posições 2, 4 e 6 do anel fenil (PM15) o composto apresenta boa inibição. Se a substituição no anel fenil for por metóxi nas posições 3 e 4, o composto não apresenta inibição (PM4), entretanto, quando a substituição nestas mesmas posições é pelo grupo

metilenodióxi, o composto gerado apresenta valor de IC_{50} inferior a 10 μM (PM6).

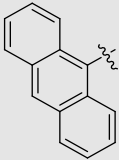
Avaliando os resultados de IC_{50} obtidos entre as famílias BC e PM, observa-se que o composto mais ativo entre as duas famílias, o PM1, possui o anel fenil substituído por um grupo metóxi na posição 4, que é o mesmo padrão de substituição encontrado em BC1, o qual é um composto inativo. Aparentemente, o fato de este substituinte estar ligado diretamente à carbonila no caso do PM1 faz com que o composto apresente valor de IC_{50} inferior a 10 μM , diferente do encontrado para o composto BC1. O anel 2-naftil gera compostos com características inibitórias semelhantes (BC8 e PM8), porém se analisarmos o anel 1-naftil, quando este está ligado à carbonila, o composto gerado (PM10) apresenta potência inibitória duas vezes e meia menor que o composto BC10, onde o 1-naftil está ligado ao carbono β insaturado.

Tabela 17. Chalconas série JA com seus respectivos resultados de IC_{50} obtidos para a YopH.

		
Chalcona	R	IC_{50} (μM) da YopH Média \pm Desvio padrão da YopH
JA1	Fenil	22,99 \pm 4,87
JA2	4-NO ₂ -fenil	14,53 \pm 3,51
JA3	2,5-diOCH ₃ -fenil	30,81 \pm 5,34
JA4	3,4-diOCH ₃ -fenil	na
JA5	3-NO ₂ -fenil	19,20 \pm 0,45
JA6	3,4-metilenodióxi-fenil	26,68 \pm 1,14
JA7	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	na
JA8	4-OCH ₃ -fenil	na
JA9	3,4-diCl-fenil	na
JA10		4,27 \pm 0,20
JA11	3,5-diOCH ₃ -fenil	na
JA12	2-naftil	na
JA13	1-naftil	na

Continua...

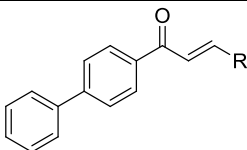
Continua...

JA14	4-CH ₃ -fenil	na
JEKP		16,74 ± 1,92

na = não ativo

A análise da série JA leva às possíveis relações: a substituição na posição 4 do anel fenil pelos grupos doadores de elétrons metil (JA14) e metóxi (JA8) levam a compostos que não apresentam inibição, já quando a substituição é feita por um grupo nitro, retirador de elétrons, o composto apresenta boa inibição (JA2). Substituintes como 1-naftil (JA13) e 2-naftil (JA12) geram compostos sem inibição, por outro lado o antracênil (JEKP) apresenta boa inibição, melhor que a apresentada pelo composto com apenas o anel fenil (JA1). O composto que apresentou melhor inibição é aquele substituído por um bifenil ligado diretamente à carbonila (JA10).

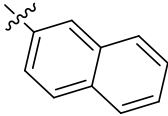
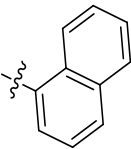
Tabela 18. Chalconas série JE com seus respectivos resultados de IC₅₀ obtidos para a YopH.



Chalcona	R	IC ₅₀ (μM) da YopH Média ± Desvio padrão da YopH
JE2	4-NO ₂ -fenil	3,07 ± 0,80
JE3	4-CH ₃ -fenil	na
JE4	3-NO ₂ -fenil	na
JE5	4-Cl-fenil	12,16 ± 1,31
JE6	3-OCH ₃ -4-OH-fenil	na
JE7	fenil	15,16 ± 1,04
JE8	4-OCH ₃ -fenil	na
JE9	3,4-diCl-fenil	16,44 ± 1,31
JE10	3,4-metilenodióxi-fenil	24,26 ± 1,49
JE11	2,5-diOCH ₃ -fenil	na

Continua...

Continua...

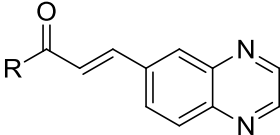
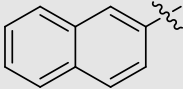
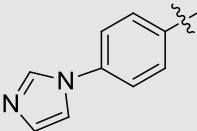
JE13	2,6-diOCH ₃ -fenil	na
JE15		6,18 ± 0,12
JE16	3,4-diOCH ₃ -fenil	na
JE17		na
JE18	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	na

na = não ativo

Com respeito à série JE, tem-se as possíveis relações: A presença de um cloro (JE5) ou um grupo nitro (JE2), ambos retiradores de elétrons, na posição 4 do fenil geram compostos com boa inibição, sendo JE2 quatro vezes mais potente que o JE5. Já a presença de grupos metila (JE3) e metóxi (JE8) também na posição 4, ambos grupos doadores de elétrons, geram compostos não ativos. Curiosamente, o grupo 1-naftil gera um composto sem inibição (JE17), porém o 2-naftil gera um composto com valor de IC₅₀ inferior a 10 µM (JE15). Dissubstituições por grupos metóxi nas posições 3,4 (JE16), 2,6 (JE13) e 2,5 (JE11) no anel fenil geram compostos inativos. Já as substituições 3,4-metilenodióxi (JE10) e 3,4 dicloro (JE9) geram compostos com boa inibição.

Quando comparadas as série JE e JA pode-se identificar que o grupo nitro na posição 4 do anel fenil exerce melhor função inibitória quando este substituinte está ligado ao carbono β (JE2). Esta inibição é quatro vezes e meia maior do que se o fenil com a mesma substituição ligada à carbonila (JA2). O grupo 2-naftil só exerce função inibitória se estiver ligado ao carbono β (JE15).

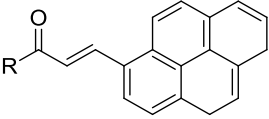
Tabela 19. Chalconas série N com seus respectivos resultados de IC₅₀ obtidos para a YopH.

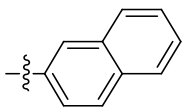
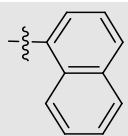
		
Chalcona	R	IC ₅₀ (μM) da YopH Média ± Desvio padrão da YopH
N2	4-OCH ₃ -fenil	na
N3	3,4-metilenodióxi	na
N4	4-Br-fenil	na
N5	fenil	na
N7	4-NO ₂ -fenil	25,10 ± 3,70
N9	2,5-diOCH ₃ -fenil	na
N10	3,4-diOCH ₃ -fenil	na
N12	2,4-diOCH ₃ -fenil	na
N14		na
N15	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	na
N16	3-OCH ₃ -4-OH-fenil	na
N17	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	na
N18	3,5-diOCH ₃ -fenil	na
N19	2-OCH ₃ -fenil	na
N20	3,5-diOCH ₃ -4-OH-fenil	na
N23	3-OCH ₃ -fenil	na
N24		na
N33	4-CN-fenil	na
N34	3-CN-fenil	na
N36	2,3,4-triOCH ₃ -fenil	na
N37	4-F-fenil	na

na = não ativo

Como na série N apenas um composto (N7) teve o valor de IC_{50} determinado, não há possibilidade de identificar padrões estruturais que justifiquem as relações entre estrutura química e atividade biológica.

Tabela 20. Chalconas série Py com seus respectivos resultados de IC_{50} obtidos para a YopH.



Chalcona	R	IC_{50} (μM) da YopH Média \pm Desvio padrão da YopH
Py1	4-NO ₂ -fenil	3,97 \pm 0,69
Py2	4-CH ₃ -fenil	na
Py3	3,4-metilenodióxi-fenil	18,79 \pm 2,96
Py4		19,29 \pm 0,84
Py5	4-OCH ₃ -fenil	na
Py6	3-OCH ₃ -4-OH-fenil	13,15 \pm 2,18
Py7		na
Py8	3,4-diOCH ₃ -fenil	na
Py9	2,5-diOCH ₃ -fenil	na
Py10	3,4-diCl-fenil	22,35 \pm 3,64
Py11	3-NO ₂ -fenil	5,02 \pm 0,47
Py12	2,4-diOCH ₃ -fenil	22,51 \pm 2,41
Py13	3,5-diOCH ₃ -fenil	na
Py14	fenil	na
Py15	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	na

na = não ativo

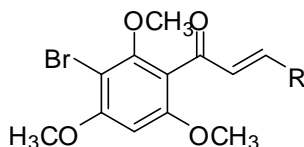
Ao analisar a série Py pode-se sugerir as seguintes relações: a substituição nas posições 3 (Py11) ou 4 (Py1) do anel fenil pelo grupo nitro geram compostos com ótima inibição. A troca do grupo fenil pelo 2-naftil gera um composto com boa inibição (Py4), já ao troca pelo 1-naftil (Py7) gera um composto inativo. De maneira geral, dissubstituições

por grupos metóxi geram compostos inativos (Py13, Py8, Py9), com exceção do composto Py12, que apresenta esta dissubstituição nas posições 2 e 4. Grupos doadores de elétrons na posição 4, como o metóxi (Py5) e o metil (Py2) geram compostos inativos, e quando a substituição nesta posição é por um grupo retirador de elétrons como o nitro (Py1) gera-se um composto que possui valor de IC_{50} inferior a 10 μM .

2.3.4.3 Estudos de REA Grupo 3

O grupo 3 abrange as séries de chalconas B, e de chalconas cíclicas H, HB e GSQ, perfazendo um total de 105 compostos, cujos representantes selecionados para análise de IC_{50} apresentaram valores que variaram de 2,28 a 78,03 μM . A análise de REA foi realizada a partir do estudo dos componentes estruturais semelhantes de cada série. Os valores de IC_{50} e as estruturas dos compostos são apresentados nas tabelas 21 a 25.

Tabela 21. Chalconas série B com seus respectivos resultados de IC_{50} obtidos para a YopH.



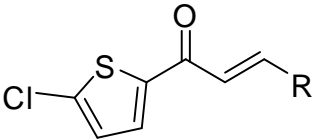
Chalconas	R	IC_{50} (μM) da YopH Média \pm Desvio padrão da YopH
B65	1-naftil	8,26 \pm 0,67
B66	2,5-diOCH ₃ -fenil	23,72 \pm 3,90
B67	4-butoxi-fenil	na
B74	4-CH ₃ -fenil	na
B75	3-NO ₂ -fenil	2,47 \pm 0,48
B77	4-OCH ₃ -fenil	na
B78	4-Cl-fenil	2,28 \pm 0,22
B81	2-COOH-fenil	na
B83	2,3,5-triOCH ₃ -fenil	na
B85	2-naftil	2,77 \pm 0,33
B89	fenil	na

na = não ativo

Ao avaliar os padrões estruturais da série B pode-se observar as seguintes relações: o substituinte 2-naftil gera um composto (B85) com inibição quase três vezes mais potente que o compostos contendo o 1-naftil (B65). A substituição na posição 4 do anel fenil por grupos doadores de elétrons como o metil (B74) e o metóxi (B77) geram compostos inativos. Já quando a substituição nesta mesma posição é feita por um grupo retirador de elétrons, como o Cl (B78), o composto apresenta valor de IC_{50} de 2,28 μ M. A dissubstituição por metóxi nas posições 2 e 5 do anel fenil leva a um composto com boa inibição (B66), entretanto, se houver uma terceira substituição por metóxi na posição 3 o composto é inativo (B83).

As duas séries contendo as chalconas heterocíclicas H e HB foram analisadas juntamente quanto às características estruturais que poderiam relacionar a inibição enzimática encontrada. A REA destas séries é apresentada logo após as tabelas 22 e 23, que apresentam os resultados encontrados para as séries H e HB.

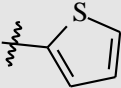
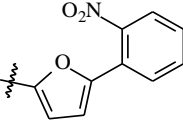
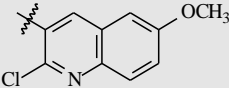
Tabela 22. Chalconas heterocíclicas série H com seus respectivos resultados de IC_{50} obtidos para a YopH.



Chalconas heterocíclicas	R	IC_{50} (μ M) da YopH Média \pm Desvio padrão da YopH
H1A	fenil	na
H2	4-Cl-fenil	na
H3	4-OCH ₃ -fenil	na
H4	4-CH ₃ -fenil	na
H6	3-NO ₂ -fenil	46,97 \pm 7,50
H7	4-F-fenil	na
H11	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	na
H12	2,4,6-triOCH ₃ -fenil	na
H14	3,4-metilenodióxi-fenil	na
H15	1-naftil	na
H16	4-OBu-fenil	na
H17	3-OCH ₃ ,4-OH-fenil	na

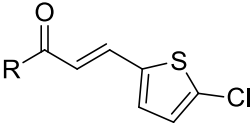
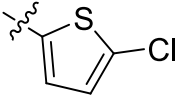
Continua...

Continua...

H19		na
H21		na
H22		14,95 ± 1,27
H24	2,5-diOCH ₃ -fenil	na
H26	4-N(CH ₃) ₂	na
H28	4-COOH	na
H29	2,3,4-OCH ₃	na
H30	2,6-OCH ₃	na

na = não ativo

Tabela 23. Chalconas heterocíclicas série HB com seus respectivos resultados de IC₅₀ obtidos para a YopH.

		
Chalconas heterocíclicas	R	IC ₅₀ (μM) da YopH Média ± Desvio padrão da YopH
HB1	fenil	na
HB2		na
HB3	4-OCH ₃ -fenil	na
HB4	4-CH ₃ -fenil	na
HB5	3,4-diCl-fenil	na
HB6	3-NO ₂ -fenil	na

Continua...

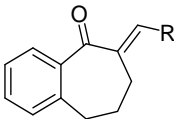
Continua...

HB7	4-F-fenil	na
HB8	4-NO ₂ -fenil	11,61 ± 0,91
HB9	4-Br-fenil	33,93 ± 6,47
HB11	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	na
HB12	2,4,6-triOCH ₃ -fenil	na
HB13	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	na
HB14	3,4-metilenodióxi fenil	na
HB15	1-naftil	46,57 ± 4,53
HB17	3-OCH ₃ ,4-OH-fenil	na
HB24	2,5- diOCH ₃ -fenil	na
HB25	3,4- diOCH ₃ -fenil	na
HB32	3- OCH ₃ -fenil	na
HB36	2- NO ₂ -fenil	na
HB37	2-naftil	na
HB40	2,5-diCl-fenil	na

na = não ativo

Com relação às séries H e HB, é possível observar os seguintes padrões: o composto contendo o substituinte 1-naftil aparentemente só apresenta inibição se ligado diretamente à carbonila (HB15), quando ligado ao carbono β insaturado não confere inibição (H15). O composto com o grupo nitro na posição 3 apresenta moderada inibição quando ligado ao carbono β insaturado (H6), se ligado diretamente à carbonila o composto não apresenta atividade inibitória (HB6). Entretanto, se o grupo nitro estiver na posição 4 do anel fenil ligado à carbonila, o composto gerado apresenta boa inibição (HB8).

Tabela 24. Benzosuberonas série GSQ com seus respectivos resultados de IC₅₀ obtidos para a YopH.

		
Benzosuberonas	R	IC ₅₀ (μM) da YopH Média ± Desvio padrão da YopH
GSQ51	4-Cl-fenil	na

Continua...

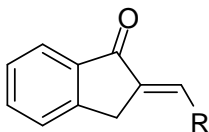
Continua...

GSQ52	4-OCH ₃ -fenil	na
GSQ53	4-butixi-fenil	na
GSQ54	3-Br-fenil	na
GSQ56	4-CH ₃ -fenil	na
GSQ57	4-F-fenil	na
GSQ58	3-NO ₂ -fenil	na
GSQ59	4-NO ₂ -fenil	na
GSQ60	4-N(CH ₃) ₂ -fenil	78,03 ± 0,11
GSQ61	fenil	na

na = não ativo

Quanto às benzosuberonas, por possuir somente um composto cujo valor de IC₅₀ foi determinado, não há possibilidade de identificar padrões estruturais que justifiquem porque o composto GSQ60 confere inibição da YopH e os demais compostos não.

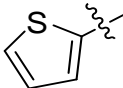
Tabela 25. Indanonas série GSQ com seus respectivos resultados de IC₅₀ obtidos para a YopH.



Indanonas	R	IC ₅₀ (μM) da YopH Média ± Desvio padrão da YopH
GSQ151	fenil	na
GSQ152	4-NO ₂ -fenil	12,80 ± 0,50
GSQ153	4-Cl-fenil	na
GSQ154	4-N(CH ₃) ₂ -fenil	na
GSQ155	4-OCH ₃ -fenil	na
GSQ156	4-CH ₃ -fenil	na
GSQ157	3-NO ₂ -fenil	26,44 ± 1,45
GSQ158	3,4-diCl-fenil	44,62 ± 2,56

Continua...

Continua...

GSQ159	3-Cl-fenil	10,92 ± 0,99
GSQ160	4-Br-fenil	na
GSQ161	4-F-fenil	na
GSQ162	4-CF ₃ -fenil	44,68 ± 2,33
GSQ163	3-CF ₃ -fenil	na
GSQ164	3-Br-fenil	na
GSQ165	4-butixi-fenil	na
GSQ166	2,6-diOCH ₃ -fenil	na
GSQ167	3,4-diOCH ₃ -fenil	na
GSQ168	2,5-diOCH ₃ -fenil	na
GSQ169	3,4-dicloro	25,51 ± 5,22
GSQ170	1-naftil	na
GSQ171	2-naftil	na
GSQ172		na

na = não ativo

Através da avaliação estrutural das indanonas pode-se identificar que o composto com um grupo nitro na posição 4 do anel fenil (GSQ152) apresenta atividade inibitória cerca de duas vezes maior do que aquele contendo o grupo nitro na posição 3 (GSQ157). A dissubstituição por cloro nas posições 3 e 4 gera um composto quatro vezes menos ativo (GSQ158) do que aquele que apresenta somente uma substituição por cloro na posição 3 (GSQ159). O composto com um grupo CF₃, retirador de elétrons, na posição 4 do anel fenil (GSQ162) conferiu inibição moderada, entretanto, o mesmo grupo CF₃ na posição 3 torna o composto inativo (GSQ163).

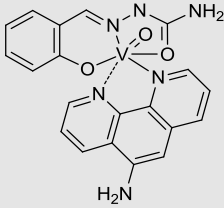
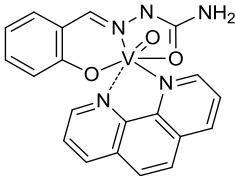
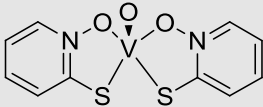
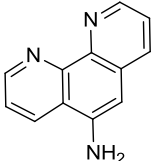
Uma característica que tanto as benzosuberonas quanto as indanonas possuem é a presença de uma estrutura rígida, esta propriedade poderia ser a razão de poucos compostos destas duas séries apresentarem uma baixa inibição da atividade catalítica da YopH.

2.3.4.4 Estudos de REA Grupo 4

Os três complexos de vanádios testados em YopH apresentaram excelentes valores de inibição, com IC₅₀ na faixa de nanomolar. É importante ressaltar que a atividade inibitória dos ligantes utilizados na síntese dos complexos também foi avaliada. Na síntese do complexo 1 foram utilizados os ligantes L1 e L4. Já na síntese do complexo 2 foram

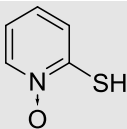
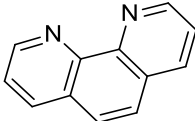
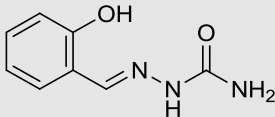
utilizados os ligantes L3 e L4. No complexo 3 foi utilizado somente o ligante 2. Observa-se que a inibição provocada pelo complexo é no mínimo 80 vezes maior que a do ligante utilizado em sua síntese (individualmente ou da mistura de dois ligantes), o que nos leva a acreditar que os ligantes devem estar “organizados” na forma de complexo para conferir a atividade inibitória pronunciada que foi observada (tabela 26). Além disso, aparentemente o grupo amino presente no ligante fenantrolina (L1) torna o complexo 1 cerca de uma vez e meia mais potente quando comparado ao complexo 2. Os valores de IC_{50} encontrados para ligantes, assim como para a mistura destes, é mostrada na tabela 26.

Tabela 26. Estrutura e valores de IC_{50} dos complexos de vanádio e seus ligantes frente à YopH de *Yersinia enterocolitica*.

Composto	Estrutura	IC_{50} (μM) da YopH Média \pm Desvio padrão
Complexo 1		$0,06 \pm 0,01$
Complexo 2		$0,10 \pm 0,01$
Complexo 3		$0,29 \pm 0,01$
L1		> 100

Continua...

Continua...

L2		23,15 ± 1,81
L3		> 100
L4		> 100
L1 + L4	Mistura 50:50 de cada ligante	> 100
L3 + L4	Mistura 50:50 de cada ligante	> 100

2.3.5 Seletividade dos melhores inibidores frente a outras fosfatases

Um quesito de relevante importância para um inibidor é a sua seletividade em relação ao alvo no qual deverá atuar. Como as PTP possuem um domínio catalítico conservado, a busca de um inibidor potente e seletivo para uma única tirosina fosfatase tem sido um desafio (ZENG et al., 2013). Os testes de seletividade têm como propósito mostrar o quanto um determinado inibidor tem maior predileção por uma enzima em relação às outras da mesma classe. A partir dos resultados obtidos nestes ensaios, combinado às observações feitas nas discussões entre estrutura química e atividade biológica, podem ser propostas modificações na molécula inibitória com objetivo de aumentar a potência e/ou seletividade desta.

No presente trabalho, foram selecionados para os testes de seletividade com outras PTP os melhores inibidores dos grupos 2, 3 e 4 citados no item anterior, assim como os melhores compostos encontrados entre os produtos naturais. No caso do grupo 1, os ensaios de seletividade foram realizados por Deise Juliana Kolling e serão discutidos em sua tese de doutorado.

Para os grupos 2 e 4 os testes de seletividade foram realizados frente às fosfatases humanas PTP1B, PEST e LYP, além das fosfatases de Mtb PtpA e PtpB. Já para o grupo 3 e para os compostos naturais, os

testes de seletividade foram realizados apenas frente à fosfatase humana PTP1B e as duas PTP de Mtb, devido à quantidade limitada dos compostos disponível para os testes.

Para determinar os índices de seletividade foram realizados ensaios de IC_{50} com os inibidores selecionados e as fosfatases citadas. Estes inibidores foram incubados por 10 minutos a 37°C com a enzima em estudo antes da adição do *p*NPP a 20 mM de concentração final (com exceção da PtpA, cuja incubação ocorreu à temperatura ambiente).

O índice de seletividade (SI), do inglês *selective index*, em relação à YopH foi calculado pela fórmula $IC_{50}^{PTP} / IC_{50}^{YopH}$. Nesta fórmula faz-se, portanto a relação do IC_{50} encontrado para uma segunda fosfatase com o IC_{50} do mesmo composto encontrado para a YopH. Quanto maior o valor encontrado de SI, mais seletivo para a YopH será o composto.

O inibidor mais potente descrito para a YopH, o ácido aurintricarboxílico, apresenta um índice de seletividade de 6,1 frente à PTP1B humana (LIANG et al., 2003).

2.3.5.1 Seletividade do grupo 2

Para determinar os índice de seletividade dos melhores compostos do grupo 2, selecionou-se 8 inibidores que apresentaram valores de IC_{50} inferiores a 6 μ M para YopH. Determinou-se então os valores de IC_{50} destes nas fosfatases PtpA e PtpB de Mtb e nas fosfatases humanas PTP1B, LYP e PEST. Os resultados de IC_{50} para cada fosfatase com estes 8 inibidores são apresentados na tabela 27.

Tabela 27. Valores de IC_{50} dos melhores inibidores do grupo 2 em YopH, PtpA, PtpB, PTP1B, LYP e PEST.

Inibidor	IC_{50} (μ M) em YopH	IC_{50} (μ M) em PtpA	IC_{50} (μ M) em PtpB	IC_{50} (μ M) em Ptp1B	IC_{50} (μ M) em LYP	IC_{50} (μ M) em PEST
PM1	2,96 \pm 0,19	18,03 \pm 1,10*	15,01 \pm 2,83*	8,30 \pm 1,31	64,40 \pm 0,74	39,36 \pm 2,26
JE02	3,07 \pm 0,80	3,05 \pm 0,06	14,63 \pm 0,48	14,42 \pm 1,35	>100	>100
BC19	3,24 \pm 0,30	19,55 \pm 5,02*	16,88 \pm 0,81*	9,01 \pm 1,20	30,33 \pm 1,98	56,47 \pm 4,13

Continua...

Continua...

PY01	3,97 ± 0,69	11,61 ± 1,07	11,81 ± 0,65	11,10 ± 1,37	70,89 ± 0,40	89,51 ± 0,11
JA10	4,27 ± 0,20	21,37 ± 3,49	12,32 ± 2,48	19,90 ± 2,90	>100	>100
PM8	5,02 ± 0,47	27,93 ± 3,46	21,49 ± 2,04	9,79 ± 1,74	>100	>100
PY11	5,02 ± 0,47	19,13 ± 1,26	19,63 ± 1,50	13,43 ± 1,10	>100	>100
PM11	5,47 ± 0,89	31,72 ± 4,55*	45,20 ± 6,59*	11,45 ± 0,97	>100	>100

Os valores representam a média e o desvio padrão de 3 ensaios independentes.

* Dados pertencentes à tese de Angela C. O. Menegatti.

A partir dos resultados de IC₅₀ obtidos para cada fosfatase, calculou-se o índice de seletividade frente à YopH, que estão apresentados na tabela 28.

Tabela 28. Índice de seletividade (SI) dos melhores inibidores do grupo 2 em PtpA, PtpB, PTP1B, LYP e PEST.

Inibid or	SI (IC ₅₀ PtpA/ IC ₅₀ YopH)	SI (IC ₅₀ PtpB/ IC ₅₀ YopH)	SI (IC ₅₀ PTP1B /IC ₅₀ YopH)	SI (IC ₅₀ LYP/ IC ₅₀ YopH)	SI (IC ₅₀ PEST/ IC ₅₀ YopH)
PM1	6,09	5,07	2,80	21,76	13,30
JE02	0,99	4,77	4,70	32,57	32,57
BC19	6,03	5,21	2,78	9,36	17,43
PY01	2,92	2,97	2,80	17,86	22,55
JA10	5,00	2,89	4,66	23,42	23,42
PM8	5,56	4,28	1,95	19,92	19,92
PY11	3,81	3,91	2,68	19,92	19,92
PM11	5,80	8,26	2,09	18,28	18,28

Os valores representam a relação do IC₅₀ do determinado inibidor para aquela fosfatase e o IC₅₀ do mesmo inibidor em YopH.

De maneira geral os melhores inibidores do grupo 2 apresentam maior seletividade para YopH quando comparados às fosfatase humanas LYP e PEST. Já a menor seletividade para a YopH ocorreu em relação à PTP1B.

Quanto à análise dos índices de seletividade feita para cada fosfatase, tem-se: O inibidor PM1 e o BC19 apresentaram cerca de seis

vezes maior predileção pela YopH do que pela PtpA, já o composto menos seletivo foi o JE02. Quando comparado à PtpB, o composto PM11 é cerca de oito vezes mais seletivo para a YopH e o inibidor que apresenta menor seletividade é o JA10. No caso da PTP1B, o mais seletivo foi o JE02 para a YopH e o menos seletivo foi o PM11. Quanto aos índices obtidos para a LYP, o inibidor que apresentou maior seletividade para YopH foi o JE02 e o que mostrou-se menos seletivo foi o BC19. Por último, em relação à PEST, os índices de seletividade mostram que o composto mais seletivo para YopH foi o JE02 e o de menor seletividade foi o PM1.

É de grande relevância que os inibidores para YopH sejam mais seletivos para esta enzima do que para as PTP humanas, pois espera-se que assim fármacos que pudessem ser produzidos com estes inibidores causem menos efeitos adversos.

Os inibidores JA10 e JE02 apresentam uma melhor inibição e seletividade pela YopH quando comparados aos valores encontrados para as primeira chalconas descritas em 2013 pelo nosso grupo (MARTINS et al., 2013). Pode-se concluir então que os inibidores JA10 e JE02 poderiam servir de molde para a síntese de novas chalconas buscando aumentar a potência e a seletividade para a YopH.

2.3.5.2 Seletividade do grupo 3

Foram selecionados 7 compostos do grupo 3 para determinação dos índices de seletividade, sendo eles as três chalconas mais ativas da série B (B75, B78 e B85), os dois representantes mais ativos das chalconas heterocíclicas (H22 e HB08) e dois representantes das indanonas (GSQ152 e GSQ159). Determinou-se então os valores de IC_{50} destes inibidores frente às fosfatases PtpA e PtpB de Mtb e à fosfatase humana PTP1B. Os resultados de IC_{50} obtidos para os compostos selecionados do grupo 3 são apresentados na tabela 29.

Tabela 29. Valores de IC_{50} dos inibidores selecionados no grupo 3 em YopH, PtpA, PtpB, e PTP1B.

Inibidor	IC_{50} (μ M) em YopH	IC_{50} (μ M) em PtpA	IC_{50} (μ M) em PtpB	IC_{50} (μ M) em Ptp1B
B78	$2,28 \pm 0,22$	$23,28 \pm 1,41^*$	$19,60 \pm 4,10^*$	$10,70 \pm 2,35$

Continua...

Continua...

B75	2,47 ± 0,48	16,67 ± 0,17*	17,70 ± 3,13*	5,58 ± 1,24
B85	2,77 ± 0,33	13,62 ± 1,25*	6,47 ± 0,20*	5,16 ± 0,86
H22	14,95 ± 1,27	50,50 ± 9,73	31,43 ± 2,24	15,70 ± 0,59
HB08	11,61 ± 0,91	23,44 ± 3,77	30,39 ± 4,79	21,80 ± 3,36
GSQ152	12,80 ± 0,50	28,93 ± 0,58	22,62 ± 5,27*	20,01 ± 3,67
GSQ159	10,92 ± 0,99	> 50	40,05 ± 0,64*	33,25 ± 4,51

Os valores representam a média e o desvio padrão de 3 ensaios independentes.

* Dados pertencentes à tese de Angela C. O. Menegatti.

Após a obtenção dos dados de IC_{50} para as 4 fosfatases, calculou-se os índices de seletividade em relação à IC_{50} da YopH (tabela 30).

Tabela 30. Índice de seletividade (SI) dos melhores inibidores do grupo 3 em PtpA, PtpB e PTP1B.

Inibidor	SI ($IC_{50}PtpA/IC_{50}$ YopH)	SI ($IC_{50}PtpB/IC_{50}$ YopH)	SI ($IC_{50}PTP1B/IC_{50}$ YopH)
B78	10,21	8,60	4,69
B75	6,75	7,17	2,26
B85	4,92	2,34	1,86
H22	3,38	2,10	1,05
HB08	2,02	2,62	1,88
GSQ152	2,26	1,77	1,56
GSQ159	4,58	3,67	3,04

Os valores representam a relação do IC_{50} do determinado inibidor para aquela fosfatase e o IC_{50} do mesmo inibidor em YopH.

De maneira geral, os inibidores selecionados do grupo 3 são menos seletivos para YopH quando comparados aos inibidores do grupo 2.

Quanto à análise dos índices de seletividade feita para cada fosfatase tem-se: o composto B78 é cerca de dez vezes mais seletivo para a YopH do que para PtpA, já o composto HB08 é o menos seletivo. Em relação à PtpB o composto B78 também é mais seletivo para YopH, e o GSQ152 é o menos seletivo. Em relação à PTP1B, o B78 e o H22 são os compostos que apresentam respectivamente maior e menor seletividade para YopH.

De todos os compostos do grupo 3, o B78 apresenta uma boa seletividade para a YopH frente as demais fosfatases testadas. Este composto seria portanto, um bom protótipo a ser utilizado no delineamento de novos inibidores para YopH.

2.3.5.3 Seletividade do grupo 4

Para avaliar a seletividade dos complexos de vanádio na YopH, determinou-se os valores de IC_{50} dos mesmos frente às fosfatases PtpA, PtpB, PTP1B, LYP e PEST. Em seguida foram calculados os índices de seletividade em relação ao valor de IC_{50} encontrado para a YopH. Por serem somente 3 inibidores os valores de IC_{50} e os índices de seletividade estão representados em uma única tabela (tabela 31).

Tabela 31. Valores de IC₅₀ para cada fosfatase e seus respectivos índices de seletividade para cada complexo

Fosfatase	Complexo 1		Complexo 2		Complexo 3	
	IC ₅₀ (μM)	SI (IC ₅₀ PTP/I C ₅₀ YopH)	IC ₅₀ (μM)	SI (IC ₅₀ PTP/ IC ₅₀ YopH)	IC ₅₀ (μM)	SI (IC ₅₀ PTP/ IC ₅₀ YopH)
YopH	0,06 ± 0,01	VR	0,10 ± 0,01	VR	0,29 ± 0,01	VR
PtpA	0,56 ± 0,03	9,3	2,69 ± 0,27	26,9	9,12 ± 0,26	31,5
PtpB	1,73 ± 0,61	28,8	5,12 ± 0,78	51,2	52,55 ± 1,56	181,2
PTP1B	0,33 ± 0,05	5,5	0,27 ± 0,02	2,7	0,78 ± 0,02	2,7
LYP	5,42 ± 1,32	90,3	6,82 ± 1,93	68,2	28,30 ± 1,71	97,6
PEST	3,97 ± 0,23	66,2	4,28 ± 0,66	42,8	41,30 ± 3,19	142,4

Os resultados correspondem à média e ao desvio padrão de 3 experimentos realizados em dias diferentes. VR = valor de referência (valor utilizado como referência para o cálculo do SI).

Os valores de SI mostrados na tabela 31 indicam que os complexos de vanádio apresentam certa seletividade para YopH. O inibidor mais potente em relação ao valor de IC₅₀, complexo 1, mostrou-se nove vezes mais seletivo para YopH quando comparado à PtpA, e

quase trinta vezes quando comparado à PtpB. Este mesmo complexo é cerca de cinco vezes mais seletivo para YopH em relação à fosfatase humana PTP1B. Este valor de SI encontrado está muito próximo ao descrito para o inibidor mais potente da YopH (LIANG et al., 2003). O complexo 1 é ainda muito seletivo quando comparado as outras duas fosfatases humanas, LYP e PEST (noventa vezes e sessenta e seis vezes, respectivamente). Estruturalmente, a única diferença entre o complexo 1 e o complexo 2 é um grupo amino no substituinte fenantrolina. Aparentemente, a presença deste grupo amino faz com que o inibidor seja mais seletivo para a YopH do que para a PTP1B.

Um aspecto importante a ser citado com relação ao complexo 1 e 2 é que já foram realizados ensaios de citotoxicidade em linhagens de células de mamíferos. O complexo 1 apresentou um valor de Tox_{50} de $50 \pm 1 \mu M$ em ensaios realizados com linhagem de macrófagos murinos (J-774) (FERNÁNDEZ et al., 2013). Já o complexo 2 apresentou valor de Tox_{50} de $188,55 \pm 21,13 \mu M$ em ensaios realizados com macrófagos humanos THP-1 (BENÍTEZ et al., 2011). Ambos os complexos apresentam portanto, um potencial a ser explorado para o desenvolvimento de possíveis fármacos, uma vez que são excelentes inibidores da YopH e apresentam baixa citotoxicidade.

2.3.5.4 Seletividade dos compostos naturais

Seis compostos naturais foram selecionados para prosseguir com os ensaios de seletividade. Estes inibidores apresentaram valores de IC_{50} inferiores a $10 \mu M$ quando testados na fosfatase de *Yersinia* spp, YopH. Os valores de IC_{50} obtidos para YopH, PtpA, PtpB e PTP1B são apresentados na tabela 32.

Tabela 32. Valores de IC_{50} oriundos dos ensaios com as fosfatases YopH, PtpA, PtpB e PTP1B.

Inibidor	IC_{50} (μM) em YopH	IC_{50} (μM) em PtpA	IC_{50} (μM) em PtpB	IC_{50} (μM) em Ptp1B
EUFR163	$1,59 \pm 0,34$	$12,10 \pm 1,60^*$	$1,21 \pm 0,08^*$	$2,85 \pm 0,25^*$
EUFR592	$2,13 \pm 0,29$	$4,02 \pm 1,23^*$	$3,07 \pm 0,18^*$	$1,94 \pm 0,17^*$
Delfinidina	$2,58 \pm 0,79$	$5,67 \pm 1,29$	$5,80 \pm 0,06$	$10,78 \pm 0,59$
AAA	$3,29 \pm 0,78$	$11,75 \pm 2,72$	$11,78 \pm 0,79$	$6,82 \pm 0,60$
CH6	$3,81 \pm 0,23$	$3,76 \pm 0,63^*$	$4,49 \pm 0,08^*$	$3,53 \pm 0,51^*$
Lupeol	$7,98 \pm 0,55$	$27,43 \pm 8,42$	$27,68 \pm 0,53$	$13,26 \pm 1,41$

Os valores representam a média e o desvio padrão de 3 ensaios independentes.

* Dados pertencentes à tese de Angela C. O. Menegatti.

Após a obtenção dos dados de IC_{50} , prosseguiu-se com os cálculos de seletividade em relação aos valores de IC_{50} apresentados nos ensaios com a YopH. Os índices de seletividade são mostrados na tabela 33.

Tabela 33. Índices de seletividade dos compostos naturais obtidos para PtpA, PtpB e PTP1B em relação à YopH.

Inibidor	SI ($IC_{50}PtpA/IC_{50}$ YopH)	SI ($IC_{50}PtpB/IC_{50}$ YopH)	SI ($IC_{50}PTP1B/IC_{50}$ YopH)
EUFR163	7,61	0,76	1,79
EUFR592	1,89	1,44	0,91
Delfinidina	2,20	2,25	4,18
AAA	3,57	3,58	2,07
CH6	0,99	1,18	0,93
Lupeol	3,44	3,47	1,66

Os valores representam a relação do IC_{50} do determinado inibidor para aquela fosfatase e o IC_{50} do mesmo inibidor em YopH.

Os compostos naturais provenientes da biblioteca avaliada no presente trabalho, de maneira geral, não são seletivos para a YopH. O mais seletivo é o compostos EUFR163 em relação à PtpA, e o composto CH6 praticamente não apresenta uma predileção entre as duas enzimas. Em relação à PtpB, o composto mais seletivo para a YopH foi o AAA, e o EUFR163 apresentou maior seletividade para a PtpB (índice de seletividade inferior a 1). Já em relação à PTP1B, o composto mais seletivo para a YopH foi a delfinidina, e o menos seletivo foi o EUFR592.

A delfinidina, entre os compostos naturais, foi o mais seletivo para a YopH frente à fosfatase humana PTP1B. Testes com novos compostos naturais estão em andamento e poderão juntamente com os dados apresentados nesta Tese, fornecer informações importantes para a busca de protótipos a serem utilizados no delineamento de novos inibidores para a fosfatase de *Yersinia*.

2.3.6 Determinação dos parâmetros cinéticos e análise do mecanismo de inibição

A partir de todos os resultados obtidos, 18 compostos foram escolhidos para os ensaios cinéticos. A seleção foi feita levando em consideração o valor de IC_{50} e/ou o índice de seletividade encontrado.

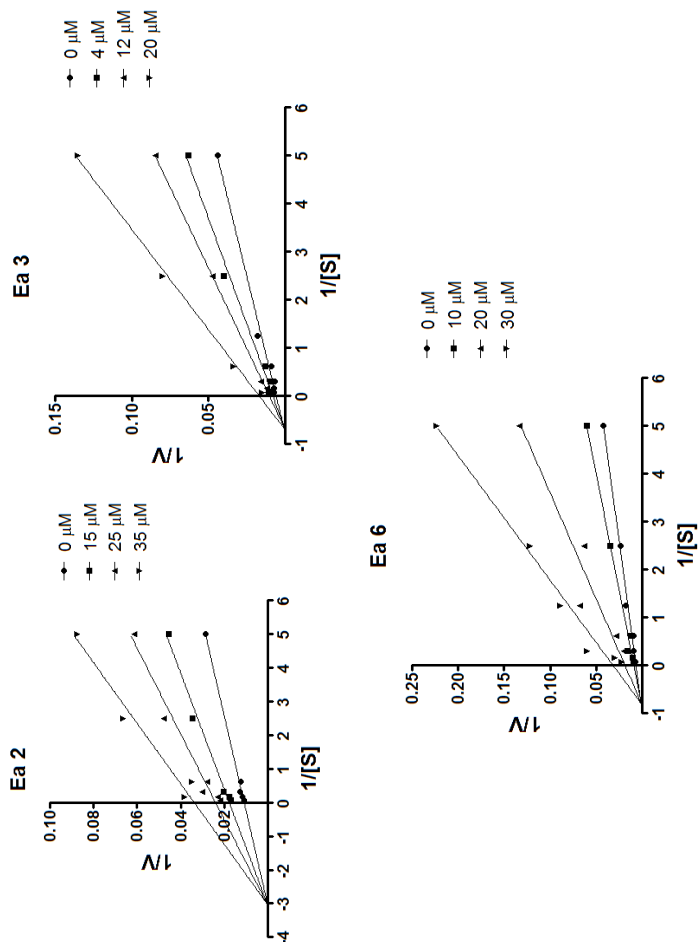
Os ensaios cinéticos foram feitos com sete concentrações distintas de *p*NPP (concentrações finais de 0,2 a 12,8 mM) e três concentrações de cada composto. A escolha das concentrações dos inibidores utilizadas nos ensaios cinéticos foi baseada nos valores de IC_{50} encontrados para os mesmos.

O mecanismo de inibição enzimática destes compostos foi definido pelos gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, que foram obtidos através da linearização das curvas de Michaelis-Menten. As curvas de Michaelis-Menten representam a relação da velocidade da reação catalítica pela variação da concentração de substrato.

2.3.6.1 Parâmetros cinéticos e modo de inibição dos compostos do grupo 1

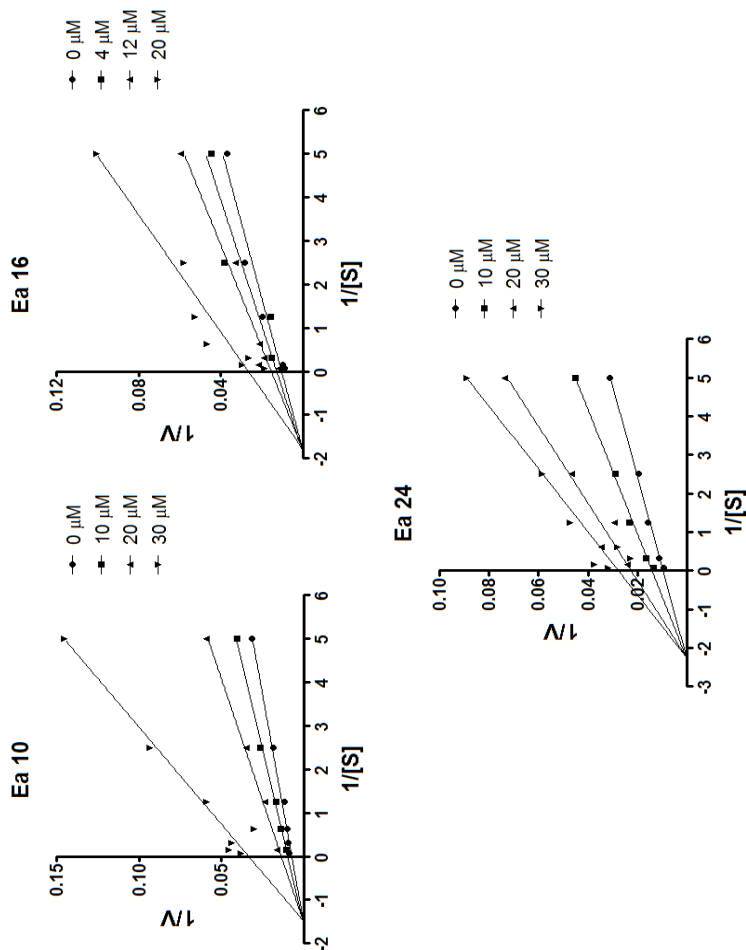
Foram determinados os parâmetros cinéticos dos seis melhores inibidores do grupo 1 (Ea2, Ea3, Ea6, Ea10, Ea16 e Ea24). Os gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk obtidos para estes compostos (figuras 15a e 15b) mostram que todas as retas convergem no eixo-x ($1/K_m$), ao mesmo tempo em que apresentam diferentes pontos de intersecção no eixo-y ($1/V_{máx}$) para diferentes concentrações do inibidor. Este perfil é condizente com uma inibição do tipo não competitiva, ou seja, o inibidor e o substrato se ligam a sítios diferentes na enzima. Os valores de K_i , K_m e $V_{máx}$ resultantes das análises dos ensaios cinéticos para estes inibidores são apresentados na tabela 34.

Figura 15 a. Perfis cinéticos das pirazolinas Ea2, Ea3 e Ea6 testadas na fosfatase YopH de *Yersinia enterocolitica*. Os gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk obtidos para estes compostos condizem com uma inibição não competitiva.



Os ensaios cinéticos foram feitos com 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8 mM de pNPP e três concentrações de cada inibidor em 20 mM de imidazol e à temperatura de 37 °C. Cada teste foi feito em duplicata em pelo menos 5 experimentos independentes. A figura mostra gráficos representativos de um destes experimentos.

Figura 15 b. Perfis cinéticos das pirazolinas Ea10, Ea16 e Ea24 testadas na fosfatase YopH de *Yersinia enterocolitica*. Os gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk obtidos para estes compostos condizem com uma inibição não competitiva.



Os ensaios cinéticos foram feitos com 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8 mM de pNPP e três concentrações de cada inibidor em 20 mM de imidazol e à temperatura de 37 °C. Cada teste foi feito em duplicata em pelo menos 5 experimentos independentes. A figura mostra gráficos representativos de um destes experimentos.

Tabela 34. Parâmetros cinéticos determinados para os melhores inibidores do grupo 1 em YopH.

Composto	[I] (μM)	$V_{\text{máx}}$ μmol $p\text{NP.mim}^{-1}.\text{mg}^{-1}$	K_{m} aparente (mM)	K_{i} (μM)
Ea2	0	$108,93 \pm 15,85$	$0,50 \pm 0,15$	$6,5 \pm 2,7$
	15	$58,85 \pm 19,40$	$0,53 \pm 0,20$	
	25	$30,70 \pm 12,04$	$0,54 \pm 0,20$	
	35	$24,82 \pm 11,12$	$0,63 \pm 0,30$	
Ea3	0	$107,57 \pm 20,63$	$0,77 \pm 0,22$	$4,5 \pm 0,7$
	4	$100,70 \pm 54,02$	$0,69 \pm 0,28$	
	12	$63,26 \pm 25,61$	$0,85 \pm 0,17$	
	20	$28,40 \pm 7,98$	$0,78 \pm 0,24$	
Ea6	0	$147,77 \pm 22,86$	$0,86 \pm 0,03$	$2,7 \pm 1,1$
	10	$104,84 \pm 24,20$	$0,85 \pm 0,02$	
	20	$58,29 \pm 24,71$	$0,83 \pm 0,04$	
	30	$26,49 \pm 2,38$	$0,82 \pm 0,04$	
Ea10	0	$94,03 \pm 12,39$	$0,51 \pm 0,12$	$3,7 \pm 1,1$
	10	$67,42 \pm 10,22$	$0,59 \pm 0,20$	
	20	$35,19 \pm 5,65$	$0,56 \pm 0,21$	
	30	$14,42 \pm 2,54$	$0,57 \pm 0,22$	
Ea16	0	$100,01 \pm 9,11$	$0,56 \pm 0,04$	$9,8 \pm 3,8$
	4	$84,80 \pm 12,69$	$0,58 \pm 0,05$	
	12	$57,31 \pm 10,99$	$0,59 \pm 0,07$	
	20	$37,16 \pm 12,32$	$0,59 \pm 0,07$	
Ea24	0	$102,06 \pm 1,46$	$0,56 \pm 0,17$	$15,8 \pm 3,0$
	10	$79,21 \pm 9,40$	$0,55 \pm 0,16$	
	20	$52,92 \pm 7,93$	$0,55 \pm 0,15$	
	30	$37,02 \pm 2,64$	$0,58 \pm 0,18$	

Uma particularidade interessante pode ser observada na cinética da pirazolina Ea6: enquanto sua chalcona precursora (R28) apresenta inibição enzimática do tipo competitiva (MARTINS, 2010; MARTINS et al., 2013), a pirazolina apresenta inibição do tipo não competitiva. Além disso, a constante inibitória (K_{i}) encontrada para a pirazolina ($2,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$) é pelo menos cinco vezes menor que de sua chalcona precursora ($14,10 \pm 0,80 \mu\text{M}$) mostrando, portanto, uma maior afinidade pela enzima.

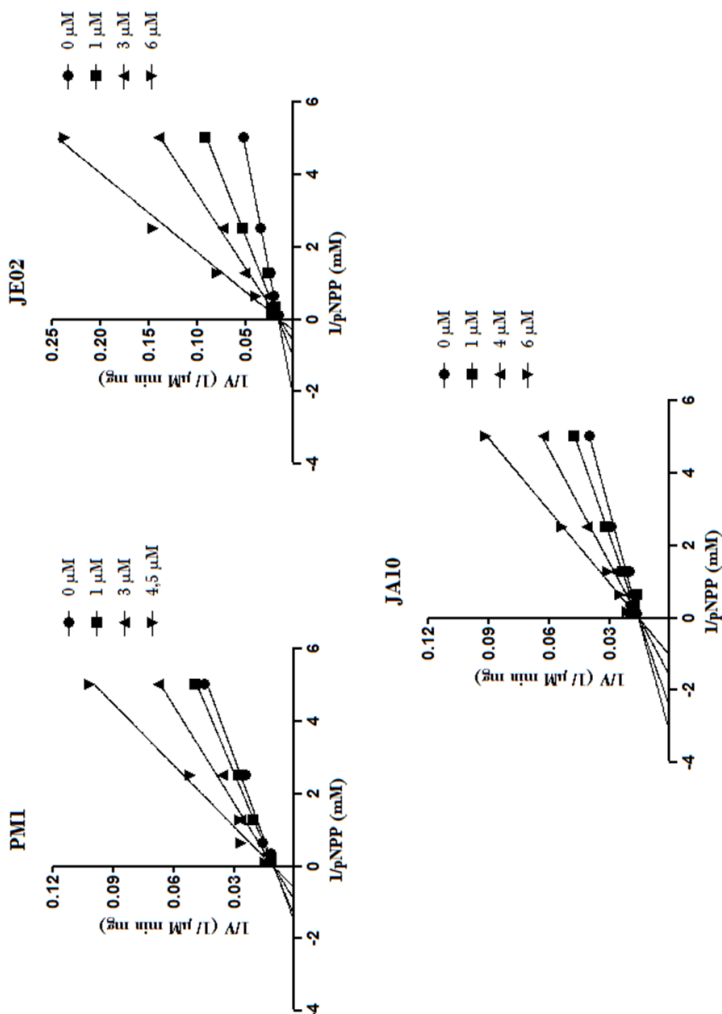
Em 2004 um grupo de pesquisas norte americano sugeriu que na estrutura da YopH há possivelmente um segundo sítio de ligação ao fosfato, assim como ocorre com a PTP1B (HU et al., 2004). Esta característica facilitaria o desenvolvimento de inibidores, pois o composto poderia atuar tanto no sítio alostérico quanto no sítio catalítico

enzimático. O tipo de inibição apresentada pelos compostos do grupo 1 poderia ser explicada por uma interação com este sítio alostérico.

2.3.6.2 Parâmetros cinéticos e modo de inibição do Grupo 2

Foram escolhidos três compostos do grupo 2 para prosseguir com os ensaios cinéticos. Selecionou-se os compostos JA10 e JE02 por serem os mais seletivos frente às fosfatases humanas, e também o composto PM1 por ser o que apresenta menor valor de IC_{50} para a YopH. Os estudos preliminares de cinética enzimática apontam que, diferentemente do perfil apresentado pelo grupo 1, nos gráficos de Lineweaver-Burk obtidos para os compostos do grupo 2, todas as retas interceptam o eixo-y ($1/V_{máx}$) no mesmo ponto, ao passo que apresentam diferentes pontos de intersecção no eixo-x ($1/K_m$) para diferentes concentrações do inibidor (figura 16). Este perfil é condizente com uma inibição do tipo competitiva, ou seja, o inibidor liga-se de maneira reversível ao mesmo sítio que o substrato normalmente ocuparia, e dessa forma, compete com o substrato por esse sítio. Os valores de K_i , K_m e $V_{máx}$ resultantes das análises dos ensaios cinéticos para estes inibidores são apresentados na tabela 35.

Figura 16. Perfis cinéticos das chalconas PM1, JE02 e JA10. A convergência das retas no eixo y nos gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk obtidos para estes compostos condizem com uma inibição do tipo competitiva.



Os ensaios cinéticos foram feitos com 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8 mM de pNPP e três concentrações de cada inibidor em 20 mM de imidazol e à temperatura de 37 °C. Cada teste foi feito em duplicata em pelo menos 5 experimentos independentes. A figura mostra gráficos representativos de um destes experimentos.

Tabela 35. Parâmetros cinéticos determinados para os melhores inibidores do grupo 2 em YopH.

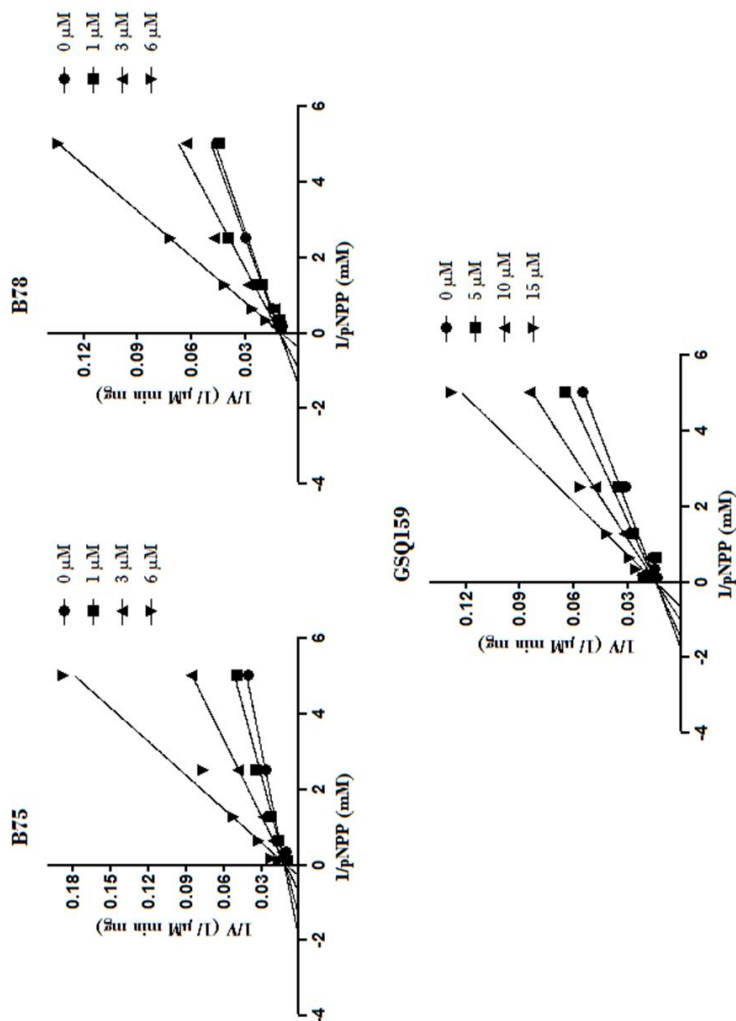
Composto	[I] (μM)	$V_{\text{máx}}$ μmol $p\text{NP.mim}^1.\text{mg}^{-1}$	K_m aparente (mM)	K_i (μM)
PM1	0	$97,10 \pm 1,34$	$0,56 \pm 0,11$	$2,45 \pm 0,19$
	1	$95,80 \pm 4,54$	$0,72 \pm 0,03$	
	3	$95,38 \pm 5,14$	$1,08 \pm 0,07$	
	4,5	$95,67 \pm 9,02$	$1,95 \pm 0,52$	
JE02	0	$63,55 \pm 2,12$	$0,37 \pm 0,09$	$1,19 \pm 0,24$
	1	$63,08 \pm 2,81$	$0,65 \pm 0,24$	
	3	$63,41 \pm 3,22$	$1,54 \pm 0,06$	
	6	$62,91 \pm 3,15$	$2,29 \pm 0,43$	
JA10	0	$63,24 \pm 2,80$	$0,36 \pm 0,13$	$3,18 \pm 0,23$
	1	$63,11 \pm 2,78$	$0,42 \pm 0,11$	
	4	$63,41 \pm 3,40$	$0,52 \pm 0,15$	
	6	$62,90 \pm 3,59$	$1,11 \pm 0,24$	

As chalconas são moléculas consideradas fáceis de serem sintetizadas e de relativo baixo custo de obtenção. Os valores de K_i encontrados para as chalconas do grupo 2 foram pelo menos três vezes menores do que os valores publicados pelo nosso laboratório para as chalconas triadas entre os anos de 2009 e 2010 (MARTINS et al., 2013). Estes resultados corroboram para a consolidação desta classe química como um campo a ser melhor explorado para a obtenção de inibidores mais seletivos e potentes contra a fosfatase YopH de *Yersinia* spp.

2.3.6.3 Parâmetros cinéticos e modo de inibição do Grupo 3

Os parâmetros cinéticos foram determinados para três compostos representantes do grupo 3 (B75, B78 e GSQ159). Estes compostos foram escolhidos por serem os mais seletivos para a YopH quando comparados à fosfatase humana PTP1B. Os ensaios preliminares de cinética enzimática revelam que estes compostos possuem uma inibição do tipo competitiva (figura 17). O composto B75 apresenta valor de K_i em escala nanomolar, mostrando ser um composto com grande afinidade pela enzima. Os compostos B78 e GSQ159 apresentaram baixos valores de K_i em escala micromolar (tabela 36).

Figura 17. Perfis cinéticos das chalconas B75, B78 e GSQ159. A convergência das retas no eixo y nos gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk obtidos para estes compostos condizem com uma inibição do tipo competitiva.



Os ensaios cinéticos foram feitos com 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8 mM de pNPP e três concentrações de cada inibidor em 20 mM de imidazol e à temperatura de 37 °C. Cada teste foi feito em duplicata em pelo menos 5 experimentos independentes. A figura mostra gráficos representativos de um destes experimentos.

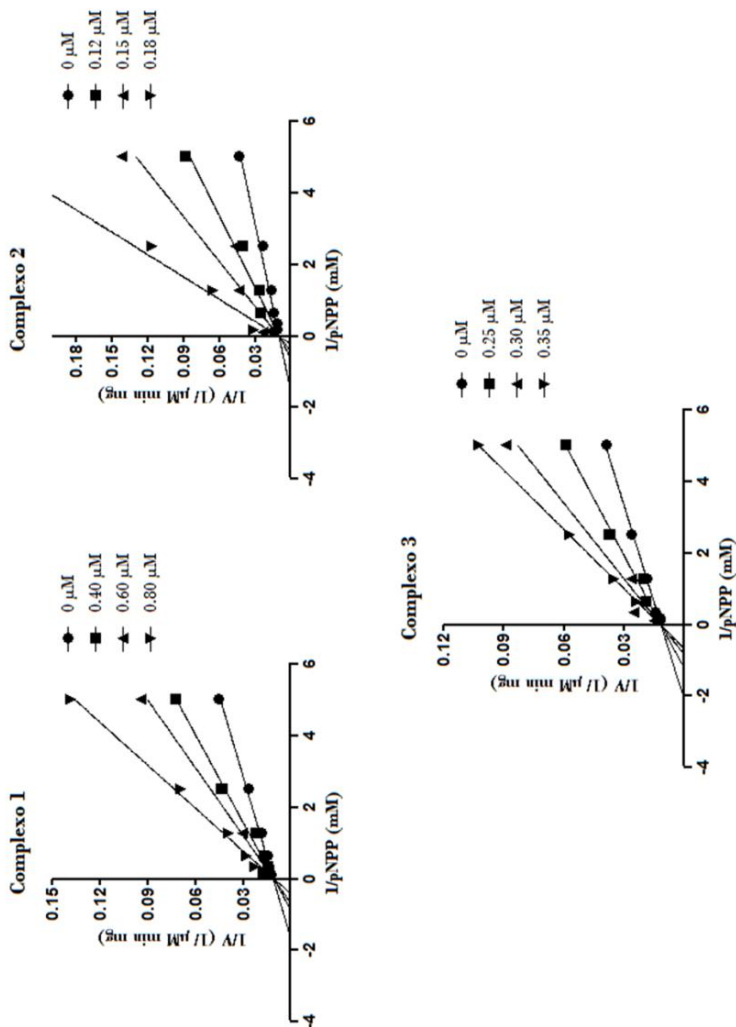
Tabela 36. Parâmetros cinéticos determinados para os melhores inibidores do grupo 3 em YopH.

Composto	[I] (μM)	$V_{\text{máx}}$ μmol $p\text{NP.mim}^1.\text{mg}^{-1}$	K_m aparente (mM)	K_i (μM)
B78	0	$81,10 \pm 10,74$	$0,52 \pm 0,18$	$2,44 \pm 1,04$
	1	$80,02 \pm 9,08$	$0,59 \pm 0,08$	
	3	$79,06 \pm 9,61$	$0,84 \pm 0,15$	
	6	$81,10 \pm 12,91$	$1,73 \pm 0,60$	
B75	0	$88,40 \pm 7,16$	$0,53 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,23$
	1	$91,48 \pm 5,32$	$0,7 \pm 0,03$	
	3	$90,69 \pm 10,40$	$1,44 \pm 0,15$	
	6	$92,21 \pm 2,99$	$3,49 \pm 0,65$	
GSQ159	0	$68,50 \pm 0,66$	$0,48 \pm 0,10$	$6,84 \pm 1,32$
	5	$67,57 \pm 0,65$	$0,66 \pm 0,02$	
	10	$66,89 \pm 0,31$	$0,88 \pm 0,06$	
	15	$66,01 \pm 0,31$	$1,40 \pm 0,03$	

2.3.6.4 Parâmetros cinéticos e modo de inibição do Grupo 4

Como foi anteriormente mostrado, os três complexos de vanádio pertencentes ao grupo 4 apresentaram excelentes valores de IC_{50} . Estes resultados instigaram a determinação de seus parâmetros cinéticos e por consequência, seus tipos de inibição. A partir dos resultados obtidos nos ensaios cinéticos, verificou-se que todos apresentam inibição do tipo competitiva, com valores de K_i em escala de nanomolar (figura 18 e tabela 37).

Figura 18. Perfis cinéticos dos complexos de vanádio 1, 2 e 3. A análise dos gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk obtidos mostra uma inibição do tipo competitiva.



Os ensaios cinéticos foram feitos com 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8 mM de pNPP e três concentrações de cada inibidor em 20 mM de imidazol e à temperatura de 37 °C. Cada teste foi feito em duplicata em pelo menos 5 experimentos independentes. A figura mostra gráficos representativos de um destes experimentos.

Tabela 37. Parâmetros cinéticos determinados para os melhores inibidores do grupo 4 em YopH.

Composto	[I] (μM)	$V_{\text{máx}}$ μmol $p\text{NP.mim}^{-1}.\text{mg}^{-1}$	K_m aparente (mM)	K_i (nM)
Complexo 1	0	$83,63 \pm 6,01$	$0,51 \pm 0,07$	$22,00 \pm 3,00$
	40	$83,93 \pm 6,57$	$1,08 \pm 0,07$	
	60	$81,57 \pm 9,81$	$1,45 \pm 0,07$	
	80	$82,93 \pm 7,76$	$2,09 \pm 0,16$	
Complexo 2	0	$81,18 \pm 9,47$	$0,47 \pm 0,09$	$19,00 \pm 5,00$
	120	$77,45 \pm 10,88$	$1,24 \pm 0,42$	
	150	$74,66 \pm 10,27$	$2,38 \pm 0,65$	
	180	$77,83 \pm 5,72$	$4,64 \pm 2,35$	
Complexo 3	0	$80,35 \pm 6,42$	$0,41 \pm 0,06$	$196,00 \pm 38,00$
	250	$79,55 \pm 6,74$	$0,76 \pm 0,03$	
	300	$79,88 \pm 6,01$	$0,95 \pm 0,17$	
	350	$80,36 \pm 2,28$	$1,23 \pm 0,29$	

O ácido aurintricarboxílico, o inibidor mais potente descrito para a YopH até o momento, foi descoberto há mais de uma década por Liang e colaboradores. Este composto apresenta um valor de K_i de 5 nM para YopH (LIANG et al., 2003). Apesar da implementação de técnicas avançadas de triagem como a triagem virtual e o HTS (do inglês *High Throughput Screening*), capazes de avaliar bibliotecas com milhares de compostos, são descritos na literatura poucos inibidores da YopH com valores de IC_{50} e K_i na faixa de nanomolar (CHEN e SETO, 2002; TAUTZ et al., 2005; VOVK et al., 2010; BAHTA et al., 2011; HU et al., 2013). Os valores de K_i obtidos para os três complexos de vanádio testados no presente trabalho estão entre os melhores descritos na literatura atual. Consolidamos, desta maneira, os organocomplexos de vanádio como uma classe química de compostos com excelente potencial a ser explorado no âmbito da inibição da YopH.

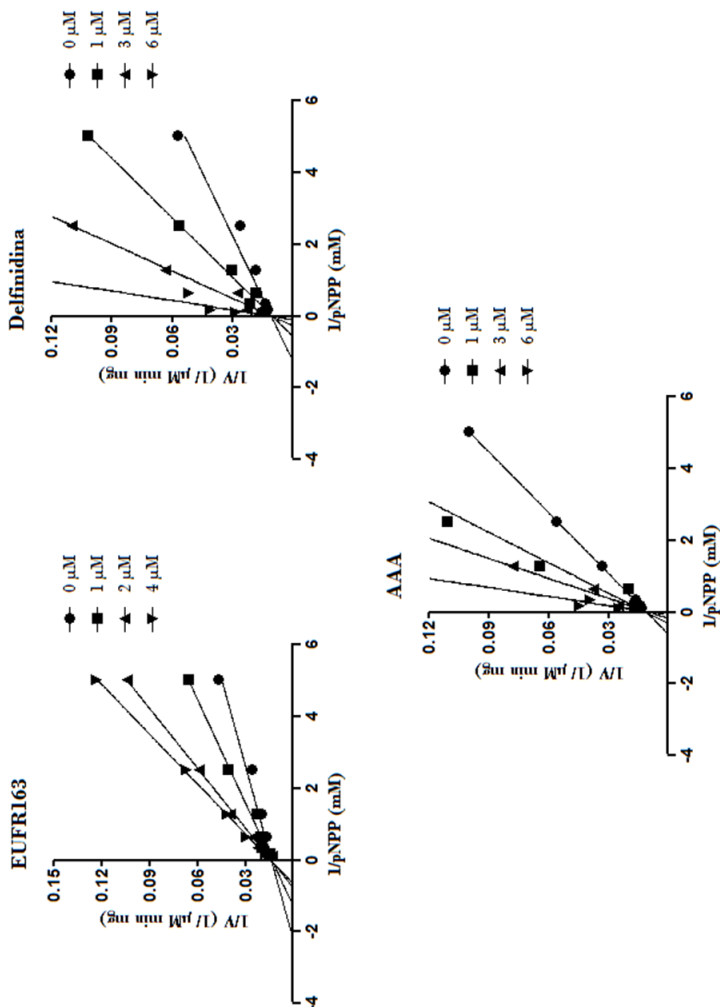
2.3.6.5 Parâmetros cinéticos e modo de inibição dos compostos naturais

Na literatura, até o presente momento, são descritos somente dois inibidores de origem natural para a YopH, a pseudoceramina B e a espermatinamina, ambos isolados da esponja marinha da ordem

Verongida. Estes inibidores apresentam valores de IC_{50} de 33 μM e 6 μM respectivamente (YIN et al., 2011). Os autores do artigo no qual estes inibidores foram apresentados não fizeram estudos cinéticos com os mesmos.

Neste trabalho, foram selecionados os compostos EUFR163, delfinidina e AAA para realização dos ensaios cinéticos em YopH. Estes três compostos foram os mais seletivos em relação à fosfatase humana PTP1B. A análise dos gráficos de Lineweaver-Burk condiz com um perfil inibitório do tipo competitivo. Os perfis cinéticos dos três compostos naturais escolhidos são apresentados na figura 19 e os parâmetros cinéticos na tabela 38.

Figura 19. Perfis cinéticos dos compostos EUFR163, Delfinidina e AAA, representantes dos compostos naturais testados na YopH. A análise dos gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk obtidos mostra uma inibição do tipo competitiva.



Os ensaios cinéticos foram feitos com 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8 mM de pNPP e três concentrações de cada inibidor em 20 mM de imidazol e à temperatura de 37 °C. Cada teste foi feito em duplicata em pelo menos 5 experimentos independentes. A figura mostra gráficos representativos de um destes experimentos.

Tabela 38. Parâmetros cinéticos determinados para os melhores inibidores dos compostos naturais em YopH.

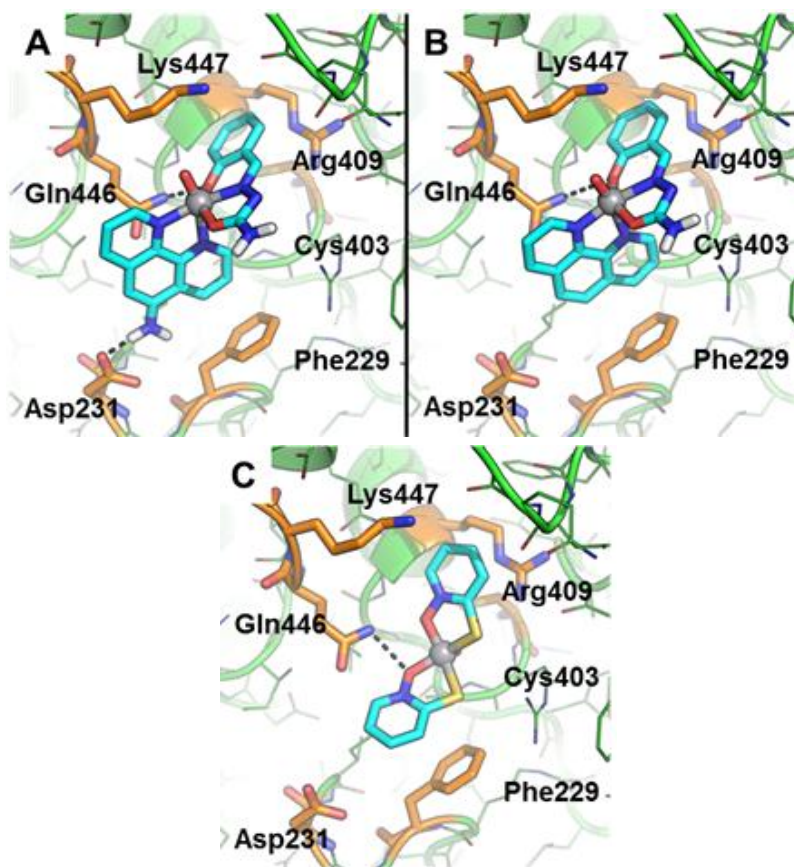
Composto	[I] (μM)	$V_{\text{máx}}$ μmol $p\text{NP.mim}^1.\text{mg}^{-1}$	K_{m} aparente (mM)	K_i (μM)
EUFR163	0	$73,60 \pm 3,06$	$0,53 \pm 0,12$	$2,06 \pm 0,80$
	1	$73,27 \pm 1,14$	$0,74 \pm 0,02$	
	2	$70,69 \pm 1,77$	$1,34 \pm 0,06$	
	4	$70,69 \pm 1,77$	$3,48 \pm 2,76$	
AAA	0	$85,75 \pm 2,23$	$0,97 \pm 0,49$	$0,96 \pm 0,36$
	1	$81,08 \pm 0,38$	$1,62 \pm 1,09$	
	3	$85,73 \pm 5,63$	$3,09 \pm 1,52$	
	6	$80,49 \pm 7,44$	$6,14 \pm 3,53$	
Delfinidina	0	$79,52 \pm 10,28$	$0,69 \pm 0,19$	$0,38 \pm 0,11$
	1	$86,46 \pm 0,86$	$1,58 \pm 0,11$	
	3	$87,78 \pm 3,27$	$5,48 \pm 2,99$	
	4,5	$70,02 \pm 4,52$	$7,98 \pm 1,99$	

A partir dos ensaios cinéticos com a YopH realizados no presente trabalho, pode-se verificar que os compostos AAA e delfinidina apresentam valores de K_i na faixa do nanomolar. Além disso, a delfinidina, pelos estudos de seletividade anteriormente citados, apresenta uma maior predileção pela YopH do que pela fosfatase humana PTP1B. Este composto representa, portanto, um ótimo inibidor da PTP YopH de *Yersinia* spp.

2.3.7 Modelagem molecular

Foram realizados estudos de modelagem molecular com os três complexos de vanádio do grupo 4. A modelagem foi feita no Departamento de Química e Tecnologia do Fármaco da Universidade de Roma (Roma, Itália) pelo Dr. Mattia Mori. Os três complexos foram projetados no sítio catalítico da YopH usando os programas AutoDock, FRED e GOLD (OpenEye OEDocking 2013. OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>; VERDONK et al., 2003; MORRIS, HUEY, et al., 2009; MCGANN, 2011). A estrutura cristalográfica da YopH (PDB 3F9B) foi a escolhida para realizar a modelagem pela sua alta resolução ($1,42 \text{ \AA}$) (BRANDÃO et al., 2009). Ressalta-se que todos os programas utilizados conferiram um modo de ligação semelhante para cada composto. A figura 20 mostra a projeção destes complexos no sítio catalítico da YopH.

Figura 20. Predição da ligação dos complexos de vanádio no sítio catalítico da YopH.



A) Projeção do complexo 1; B) Projeção do complexo 2; C) Projeção do complexo 3. Os ligantes são representados em ciano e o vanádio como uma esfera cinza. A estrutura cristalográfica da YopH é representada em verde e os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação ao complexo em laranja. Ligações de hidrogênio são representadas como linhas pretas pontilhadas.

Os complexos de vanádio ocupam o sítio catalítico da YopH nas proximidades da cisteína 403 (Cys403). A ligação destes complexos é reforçada por interações cátion- π com a arginina 409 (Arg409) e lisina 447 (Lys447). Há ainda ligações de hidrogênio estabelecidas com

a glutamina 446 (Gln446) e interações pi-pi com a cadeia lateral da fenilalanina 229 (Phe229).

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A YopH é uma enzima importante para a patogênese das espécies do gênero *Yersinia* e, portanto, representa um alvo terapêutico a ser explorado. No presente trabalho, 398 compostos de uma biblioteca contendo diferentes classes químicas foram triados como possíveis inibidores desta enzima. Após os testes de triagem, 100 compostos foram selecionados para a realização dos ensaios de IC₅₀, nos quais foram obtidos valores que variaram de 0,06 µM a >100 µM.

Entre as classes químicas testadas, oito novas chalconas (PM1, JE02, BC19, PY01, JA10, PM8, PY11 e PM11) mostraram baixos valores de IC₅₀ para a YopH (< 6 µM), sendo portanto, mais potentes do que as primeiras chalconas relatadas por nosso grupo como inibidores desta enzima (MARTINS et al., 2013).

Os ensaios cinéticos realizados com as seis pirazolinhas mostraram que as mesmas apresentam inibição do tipo não competitiva, esta característica poderia ser trabalhada de maneira a buscar inibidores mais seletivos para a YopH. Inibidores não competitivos podem evitar inibição de outras fosfatases por atuarem em outros sítios que não o catalítico, que é conservado para esta classe de enzimas.

Destacam-se ainda outras duas classes químicas, os complexos de vanádio e compostos naturais, que apresentaram neste trabalho ótima inibição da YopH e são pouco descritas na literatura como inibidores desta enzima. Cinco inibidores destas duas classes (delfinidina, AAA e os três complexos de vanádio) apresentaram valores de K_i em escala nanomolar nos ensaios cinéticos. Comparando com dados da literatura, os valores de IC₅₀ e K_i destes cinco compostos estão entre os melhores descritos para a PTP YopH de *Yersinia* spp.

Destaca-se estes novos inibidores da YopH como protótipos para a construção de novos inibidores, buscando sempre o incremento da potência do efeito inibidor e uma maior seletividade para esta enzima.

2.5 PERSPECTIVAS

Espera-se dar continuidade a este trabalho, tendo como perspectivas:

A realização da modelagem molecular com os demais compostos cujos parâmetros cinéticos foram determinados.

Uma vez que a YopH tem como alvo as células de defesa, pretendemos avaliar a citotoxicidade em linhagem de macrófagos dos melhores inibidores descritos neste trabalho.

Realizar ensaios de permeabilidade celular e de inibição do crescimento bacteriano.

Realizar estudos da interação entre a YopH e os inibidores através das técnicas de calorimetria de titulação isotérmica e de espectrometria de massa.

Em cooperação com os laboratórios de química, avaliar os padrões estruturais dos melhores inibidores a fim de direcionar a síntese de novos compostos a serem triados.

Continuar buscando novos inibidores potentes e seletivos para YopH, auxiliando assim na busca de ferramentas moleculares que possam ser utilizadas para melhor entender a ação desta enzima na invasão do hospedeiro.

Esperamos que este trabalho possa auxiliar na consolidação da YopH como um alvo a ser estudado para o desenvolvimento de novos fármacos.

3. CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO CITOTOXICOLÓGICA E ANTITUBERCULAR DE 6 COMPOSTOS PREVIAMENTE DESCRITOS COMO INIBIDORES DAS PTP PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivo principal usar as técnicas que envolvem os modelos experimentais celulares humanos para testar inibidores das fosfotirosina fosfatases PtpA e PtpB de *M. tuberculosis*, assim como compreender ainda mais sobre a bioquímica envolvida na atividade destas duas fosfatases na infecção do macrófago pelo *M. tuberculosis*.

3.1.2 Objetivos Específicos

- Cultivar a linhagem celular humana THP-1.
- Cultivar a linhagem celular humana HepG2.
- Cultivar e perpetuar a cepa *Mycobacterium bovis* (BCG) usada no desenvolvimento da vacina contra tuberculose.
- Realizar os ensaios de infecção de macrófagos com BCG-GFP.
- Realizar ensaios de citotoxicidade com inibidores das fosfatases PtpA e PtpB descritos previamente por nosso grupo de pesquisa (CHIARADIA et al., 2012).
- Analisar a atividade antitubercular destes inibidores.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Inibidores utilizados nos ensaios de MIC, citotoxicidade e infecção intracelular

Em 2012 foram relatados por nosso laboratório 6 compostos com atividade inibitória das PTP de Mtb (PtpA e PtpB) (Apêndice B) (CHIARADIA et al., 2012). Estes compostos são chalconas e foram sintetizadas pela Dra. Louise Domeneghini Chiaradia-Delatorre durante sua Tese de Doutorado realizada no LEAT, sob orientação do Prof. Ricardo José Nunes (CHIARADIA, 2010).

Com o intuito de verificar a citotoxicidade duas linhagens celulares humanas foram utilizadas (HEPG2 e THP1). A HepG2 é uma linhagem celular de hepatocarcinoma humano usada para detectar hepatotoxicidade induzida por fármaco, uma avaliação muito importante feita nos primeiros estágios no desenvolvimento de um fármaco. A linhagem celular de leucemia monocítica humana THP-1 é usada no estudo biológico de monócitos e macrófagos. Estas duas linhagens celulares eram utilizadas como padrão pelo laboratório da GSK nos testes de citotoxicidade.

Avaliou-se também a atividade antitubercular destas chalconas nas cepa usada como vacina *Mycobacterium bovis* BCG e também na cepa patogênica Mtb H37Rv. Avaliou-se também a atividade destas chalconas em ensaios de infecção de THP1 com BCG.

3.2.2 Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Um cultivo de uma cepa de Mtb (BCG ou H37Rv) em meio Middlebrook 7H9 suplementado com 10 % de ADC e 0,05 % de tiloxapol foi incubado a 37 °C por aproximadamente 10 dias. Preparou-se então a partir deste cultivo, um inóculo com aproximadamente 1×10^5 CFU/ml usando o meio de cultura anteriormente citado. O preparo deste inóculo foi feito levando-se em consideração a densidade óptica (DO) a 600 nm, usou-se como referência que uma densidade óptica de 1,125 tem 1×10^7 CFU/ml.

As seis chalconas em estudo foram solubilizadas em DMSO 100% e em seguida diluições seriadas destas foram transferidas para microplacas de 96 poços de fundo chato contendo 95 µl de meio Middlebrook 7H9 suplementado com 10 % de ADC e 0,05 % de

tiloxapol. A esta placa foram adicionados 100 µl do inóculo de Mtb por poço.

Foram testadas oito concentrações distintas de cada chalcona, onde a menor concentração do ensaio foi de 3,9 µM e a maior de 500 µM (com exceção da chalcona 96 que foi testada nas concentrações finais de 0,39 µM a 50 µM).

Como controle interno do ensaio foi utilizada uma diluição seriada de isoniazida com concentração final que variava de 0,03 a 4 µg/ml. Como controle positivo foi utilizado DMSO à concentração final de 2,5 % e como controle negativo uma solução aquosa de rifampicina na concentração final de 7,5 µg/ml. As placas foram feitas em duplicata.

Após o acréscimo do inóculo de Mtb, as placas foram seladas com papel parafilme e incubadas por seis dias a 37 °C.

Após o período de incubação, 25 µl de uma solução de resazurina (uma pastilha de resazurina BDH[®] em 30 ml de PBS estéril) foram adicionados a cada poço e as microplacas foram então incubadas a 37 °C por mais dois dias.

Células viáveis são capazes de reduzir a resazurina, que possui coloração azul, à resorufina que possui coloração rosa e é um composto altamente fluorescente. Quanto mais células vivas estiverem presentes, maior será a fluorescência liberada e mais rosado ficará o meio.

Após este período de incubação, a fluorescência foi medida usando o equipamento M5 Spectramax da Molecular Devices (excitação a 530 nm, emissão a 590 nm e a linha de corte a 570 nm). A concentração inibitória foi estimada usando GraphPad Software 5.00 a partir de uma curva dose-resposta sigmoide gerada ao plotar a porcentagem de inibição do crescimento micobacteriano versus o logaritmo da concentração do composto. O valor da concentração inibitória mínima (MIC) corresponde à concentração do composto necessária para impedir 90 % do crescimento micobacteriano.

3.2.3 Ensaio de citotoxicidade com a linhagem celular humana HepG2

Um cultivo de HepG2 em EMEM suplementado com 10 % de FBS e 2 mM de L-glutamina foi incubado a 37 °C, 5 % de CO₂ e 95 % de umidade até que estas células ficassem confluentes. As células foram então removidas da garrafa de cultivo por tripsinização e centrifugadas (400 g por 5 minutos a temperatura ambiente). Em seguida as células

foram ressuspensas no meio de cultivo e contadas com um contador de células automático. Preparou-se em seguida, uma suspensão de 1×10^5 células/ml usando o meio anteriormente citado. Foram transferidos desta suspensão 100 μ l para cada poço de microplacas de 96 poços preta com fundo transparente para cultivo de tecido tratada com colágeno do tipo 1 (exceto em uma coluna desta microplaca onde somente 100 μ l do meio de cultivo foram adicionados, esta coluna foi considerada o controle negativo). As microplacas contendo as células foram incubadas por 24 horas a 37 °C, 5 % CO₂ e 95 % de umidade.

Diluições seriadas das seis chalconas em estudo, previamente solubilizadas em DMSO 100 %, foram transferidas para microplacas de 96 poços de fundo chato contendo 360 μ l de EMEM suplementado com 5 % de FBS e 2mM de L-glutamina. Foram testadas dez concentrações distintas de cada chalcona, onde a menor concentração do ensaio foi de 0,1 μ M e a maior de 50 μ M.

Como controle interno do ensaio foi utilizada uma diluição seriada de doxorubicina com concentração final que variava de 0,002 a 1 μ M. Como controle positivo foi utilizado DMSO à concentração final de 0,5 %.

Em seguida, o meio de cultivo foi removido da microplaca contendo as células HepG2 e substituído pelo meio contendo as diluições dos compostos/DMSO (125 μ l por poço). Cada diluição seriada dos compostos foi adicionada em duas replicatas. A microplaca foi então incubada por 48 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ e 95 % de umidade.

Após o tempo de incubação, a solubilidade dos compostos foi opticamente checada com o uso de um microscópio invertido. O meio de cultivo desta microplaca foi então removido e 250 μ l de uma solução de resazurina* foram adicionados em cada poço. A microplaca foi incubada por uma hora e meia a 37 °C, 5 % de CO₂ e 95% de umidade seguida de uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi acompanhada pela emissão de fluorescência através da redução da resazurina a resorufina. A fluorescência foi medida usando o leitor de microplacas 1420 Multilabel HTS counter Victor Wallac (excitação lida a 515 nm e emissão a 590 nm).

A citotoxicidade foi estimada usando uma curva dose-resposta sigmoidal plotada pela porcentagem de inibição do crescimento versus o log da concentração do composto usando o software GraphPad 5.00. O valor de Tox₅₀ corresponde à concentração do composto necessária para inibir 50 % do crescimento celular quando comparado ao controle positivo.

* Uma pastilha de resazurina foi dissolvida em tampão fosfato salino (PBS) à concentração de 0,0042 %. Então para cada microplaca, 6,25 ml desta solução foram misturados a 25 ml de meio EMEM suplementado com 5 % de FBS e 2 mM de L- glutamina, 250 µl desta mistura foram adicionados em cada poço da microplaca.

3.2.4 Ensaio de citotoxicidade com a linhagem celular humana THP1

Um cultivo de THP-1 em meio RPMI-1640 suplementado com 10 % de FBS, 1mM de piruvato de sódio e 2 mM de L-glutamina foi incubado a 37 °C, 5 % de CO₂ e 95 % de umidade. Estas células foram então centrifugadas (400 g por 5 minutos à temperatura ambiente) e ressuspendidas em meio de cultura suplementado com 5 % de FBS e contadas usando um contador de células automático. Em seguida, preparou-se uma suspensão de 5×10^4 célula/ml usando o meio anteriormente citado. Foram transferidos 50 µl desta suspensão para cada um dos poços da microplaca de 96 poços preta com fundo transparente para cultivo de tecido tratada com colágeno do tipo 1 (exceto na coluna 11 desta microplaca onde somente 50 µl do meio de cultivo foram adicionados).

Diluições seriadas das seis chalconas em estudo, previamente solubilizadas em DMSO 100 %, foram transferidas para microplacas de 96 poços de fundo chato contendo 200 µl de RPMI-1640 suplementado com 5 % de FBS, 1 mM de piruvato de sódio e 2 mM de L-glutamina.

Logo em seguida, 50 µl do meio contendo as diluições dos compostos foram adicionados à microplaca contendo as células. Cada diluição seriada dos compostos foi feita em duas replicatas. Foram testadas dez concentrações distintas de cada chalcona, onde a menor concentração do ensaio foi de 0,1 µM e a maior de 50 µM.

Como controle interno do ensaio foi utilizada uma diluição seriada de doxorubicina com concentração final que variava de 0,002 a 1 µM. Como controle positivo foi utilizado DMSO à concentração final de 0,5 %.

As placas foram então incubadas por 48 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ e 95 % de umidade.

Após dois dias de incubação, a solubilidade dos compostos foi checada opticamente com o uso de um microscópio invertido. Em seguida, a cada poço foram acrescentados 100 µl da solução do kit de detecção de luminescência (Kit ATPlite, PerkinElmer®). A microplaca

foi agitada por 1 minuto e a luminescência foi medida usando o leitor de microplaca 1420 Multilabel HTS counter Victor Wallac.

O ATP é um marcador de células vivas, estando presente em todas as células metabolicamente ativas. A detecção do ATP baseia-se na produção de luz pela reação do ATP com a adição de luciferase e D-luciferina. A luz emitida é proporcional à concentração de ATP.

A citotoxicidade foi estimada usando uma curva dose-resposta sigmoidal plotada pela porcentagem de inibição do crescimento versus o log da concentração do composto usando o software GraphPad 5.00. O valor de Tox_{50} corresponde à concentração do composto necessária para inibir 50 % do crescimento celular quando comparado ao controle positivo.

3.2.5 Ensaio intracelular: infecção das células THP-1 com BCG-GFP

Um cultivo de THP-1 em meio RPMI-1640 suplementado com 10 % de FBS, 1 mM de piruvato de sódio e 2 mM de L-glutamina foi incubado a 37 °C, 5 % de CO₂ e 95 % de umidade. Estas células foram então centrifugadas (400 g por 5 minutos à temperatura ambiente), ressuspensas em meio de cultura e contadas usando um contador de células automático. Uma garrafa de cultivo foi preparada com 50 ml de uma suspensão de célula com 5×10^5 célula/ml feita com mesmo meio já citado, a essa garrafa foi acrescentado PMA à concentração final de 20 ng/ml para induzir a diferenciação dos monócitos a macrófagos. Interferon gama também foi acrescentado à garrafa na concentração final de 30 ng/ml para induzir a ativação dos macrófagos. Outra garrafa de cultivo foi preparada nas mesmas condições anteriormente citadas com exceção da adição do interferon gama. Ambas as garrafas foram incubadas por 24 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ e 95 % de umidade.

As células de cada garrafa foram então removidas por tripsinização e centrifugadas a 400 g por 5 minutos à temperatura ambiente em dois tubos de 50 ml (um para cada garrafa). As células foram em seguida ressuspensas em meio de cultura e contadas com um contador de células. Uma nova garrafa foi preparada com 50 ml de uma suspensão de célula com 5×10^5 células/ml feita com mesmo meio já citado e a essa garrafa foram acrescentados 1 α ,25-Dihidroxivitamina D₃ na concentração final de 20 nM para induzir a diferenciação de monócitos a macrófagos e interferon gama na concentração final de 30 ng/ml. Uma segunda garrafa, usada como controle negativo da ativação

do macrófago, foi preparada da mesma forma que a anterior com exceção da adição do interferon gama. A ambas as garrafas foi acrescentado uma suspensão de BCG-GFP em uma proporção de 10 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por célula humana. Essa suspensão de BCG-GFP foi preparada com meio RPMI-1640 suplementado com FBS 10%, 1 mM de piruvato de sódio e 2 mM de L-glutamina e usando a densidade óptica a 600 nm levando em consideração que densidade óptica de 1,125 tem 1×10^7 CFU/ml. As garrafas foram deixadas por 24 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ e 95% de umidade.

Depois destas 24 horas, o meio de cultivo que estava nas garrafas foi removido e as células foram lavadas com meio de cultivo novo para remover as bactérias extracelulares. As células foram em seguida removidas das garrafas por tripsinização e centrifugadas separadamente (400 g por 5 minutos à temperatura ambiente). As células foram então ressuspensas separadamente em meio de cultivo suplementado com FBS 10 % e contadas usando um contador de células. Uma suspensão de células a $3,6 \times 10^5$ células/ml foi preparada para cada condição (macrófagos ativados e não ativados). Em seguida 25 µl de cada suspensão foram transferidos para duas microplacas de 384 poços preta com fundo transparente revestida com colágeno (uma microplaca para cada condição).

Diluições seriadas das seis chalconas em estudo, previamente solubilizadas em DMSO 100 %, foram transferidas para microplacas de 96 poços de fundo chato contendo 200 µl de RPMI-1640 suplementado com 5 % de FBS, 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina, 20 nM de 1 α ,25-Dihidroxitamina D₃ e 30 ng/ml de INF- γ (o interferon gama foi usado somente em uma das microplacas de 96 poços com fundo chato). Foram transferidos 25 µl do meio contendo as diluições dos compostos às microplacas de 384 poços contendo as células.

Cada diluição seriada dos compostos foi feita em duas replicatas. Foram testadas dez concentrações distintas de cada chalcona, onde a menor concentração final do ensaio foi de 0,20 µM e a maior de 100 µM. Foram usadas como controles internos do ensaio diluições de rifampicina (com concentrações finais que variavam de 0,75 ng/ml a 1,5 pg/ml) e diluições de oxifenbutazona (com concentrações finais que variavam de 0,244 a 500 µM). Como controle positivo foi utilizado DMSO à concentração final de 0,5 %.

Após 5 dias, as células foram fixadas através da adição de formaldeído à concentração final de 4 %. As microplacas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida as

células foram lavadas com HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) para remover o formaldeído. Foram adicionados a cada poço das microplacas 50 µl de uma solução de DraQ5 em HBSS na concentração final de 5 µM e então as microplacas foram incubadas à temperatura ambiente por uma hora.

DraQ5 é um fluoróforo capaz de corar DNA, o comprimento de onda de excitação desta substância é 647 nm e a emissão ocorre em 665 nm. O DraQ5 pode ser utilizado em células marcadas com GFP.

As microplacas foram analisadas usando microscópio Opera a 488/520 nm e 635/690 nm. Através da microscopia confocal pode-se analisar as micobactérias marcadas com GFP no interior das células marcadas com DraQ5. Com o uso de cálculos, estipula-se a taxa de infecção celular nos controles positivos e compara-se com a taxa de infecção das células tratadas com a chalcona em análise.

O comportamento dose-resposta de cada composto foi analisado através do gráfico da porcentagem de células infectadas e log do número de células versus a concentração do composto (µM) usando o software GraphPad 5.00.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 39 mostra alguns inibidores das enzimas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* com seus valores de IC₅₀ descritos na literatura até o momento, incluindo chalconas e sulfonilhidrazonas publicadas pelo nosso grupo de pesquisas.

Tabela 39. Alguns inibidores das fosfatases PtpA e PtbB de Mtb com seus respectivos valores de IC₅₀.

Inibidor	PtpA IC ₅₀	PtpB IC ₅₀	Referências
Análogos de estevastelinas, roseofilinas e prodigiosinas	8,8 - 28,7 μ M		(MANGER et al., 2005)
Oxalilamino-metilenotiofeno sulfonamida (OMTS)		0,44 μ M	(GRUNDNER et al., 2007)
Derivado isoxazólico		220 nM*	(SOELLNER et al., 2007)
Sais de molibdênio, vanádio e tungstênio	24,5 - 30,8 μ M		(MADHURANTAKAM et al., 2008)
Compostos com esqueleto de benzanilida	1,4 μ M*		(RAWLS et al., 2009)
Peptídeos cíclicos	8,0 μ M*		(CHANDRA et al., 2010)
Derivado do ácido salicílico		1,08 μ M	(ZHOU et al., 2010)
Sulfonilhidrazonas		18 - 41 μ M	(OLIVEIRA et al., 2011)

Continua...

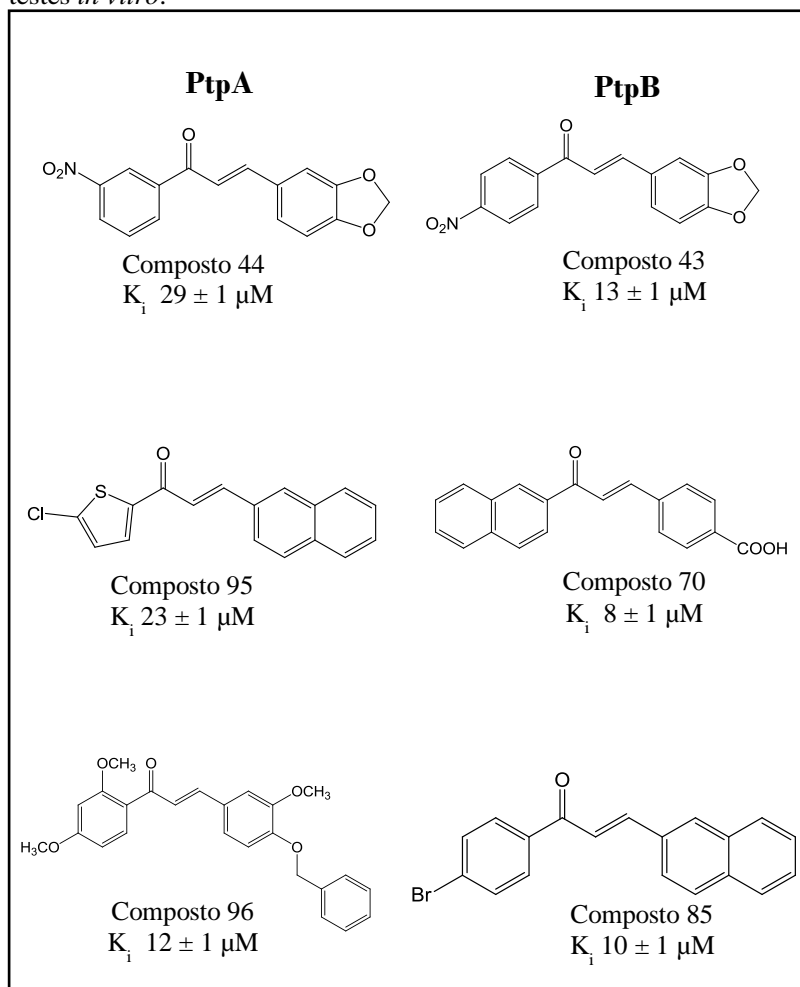
Continua...

Chalconas sintéticas	8,4 - 45 μM	12 - 51 μM	(CHIARADIA et al., 2008; CHIARADIA et al., 2012)
-----------------------------	------------------------	-----------------------	--

* Valores de K_i .

Em 2012, nosso grupo de pesquisas no Brasil identificou 6 chalconas como inibidores competitivos e seletivos da PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*. Estes seis compostos apresentaram K_i e IC_{50} em concentrações na faixa do micromolar em ensaios *in vitro* (Figura 21) (CHIARADIA et al., 2012). Nenhum dado sobre toxicidade e atividade antitubercular destes compostos era conhecido na época desta publicação, no entanto, uma grande oportunidade de conseguir estas informações surgiu no decorrer de 2012, quando uma parceria entre o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a indústria farmacêutica GlaxoSmithKline (GSK) foi estabelecida. Esta parceria concedeu à autora desta tese uma bolsa de estudos nos laboratórios da GSK em Tres Cantos, Espanha, onde houve a oportunidade de aprender as metodologias envolvidas no cultivo de células humanas, citotoxicidade, Concentração Inibitória Mínima (MIC) e infecção de macrófagos humanos com BCG *in vitro*.

Figura 21. Inibidores competitivos e seletivos da PtpA do Mtb. Todos os compostos apresentaram valores de K_i na faixa do micromolar em testes *in vitro*.



Adaptado de CHIARADIA et al., 2012.

Os resultados apresentados a seguir foram obtidos no período de setembro de 2012 a agosto de 2013, nos laboratórios da GSK em Tres Cantos, Espanha sob supervisão do Dr. Alfonso Mendoza-Losana. Os resultados preliminares obtidos com estas seis chalconas foram apresentados na III Escola de Verão organizada pela Sociedade

Espanhola de Química Terapêutica (SEQT) (o resumo aceito é apresentado no apêndice C).

3.3.1 Determinação da IC₉₀ dos inibidores seletivos da PtpA e PtpB

Chalconas são compostos que são intermediários na biossíntese de flavonóides em plantas. Muitas propriedades biológicas são atribuídas a estes compostos, incluindo atividades antitumoral (WON et al., 2005), antimalárica, antileishmaniose (LIU et al., 2003) e antibacteriana (PAPPANO et al., 1985; LIN et al., 2002). Chalconas são estruturalmente simples e podem ser sintetizadas com baixo custo. Nosso grupo de pesquisa no Brasil tem publicado desde 2008 a atividade de derivados de chalconas como bons inibidores de PtpA e PtpB de Mtb e YopH de *Yersinia enterocolitica* (CHIARADIA et al., 2008; MASCARELLO et al., 2010; MARTINS et al., 2013).

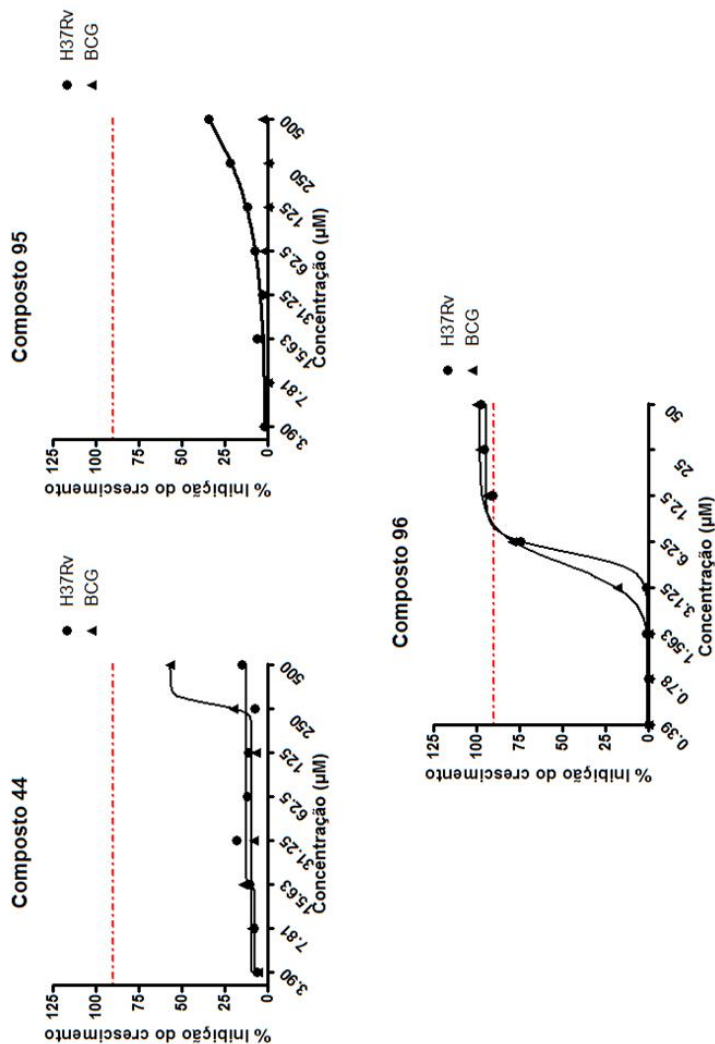
Recentemente, seis chalconas foram apresentadas como novos e potentes inibidores da PtpA e PtpB de Mtb em ensaios *in vitro* (CHIARADIA et al., 2012). Nos laboratórios da GSK nós investigamos o efeito destes seis compostos na sobrevivência da cepa usada como vacina *Mycobacterium bovis* BCG e também na cepa patogênica Mtb H37Rv. A tabela 40 mostra os valores de IC₉₀ para cada composto e para cada cepa. As curvas dose-resposta obtidas para cada composto são apresentadas na figura 22a e figura 22b.

Tabela 40. Valores de IC₉₀ para *M. bovis* BCG e para Mtb H37Rv das seis chalconas avaliadas.

Composto	IC ₉₀ (μM) para <i>M. bovis</i> BCG	IC ₉₀ (μM) para Mtb H37Rv
43	*	*
44	*	*
70	35,46 ± 2,98	64,77 ± 3,27
85	*	*
95	*	*
96	6,8 ± 1,24	7,88 ± 0,46

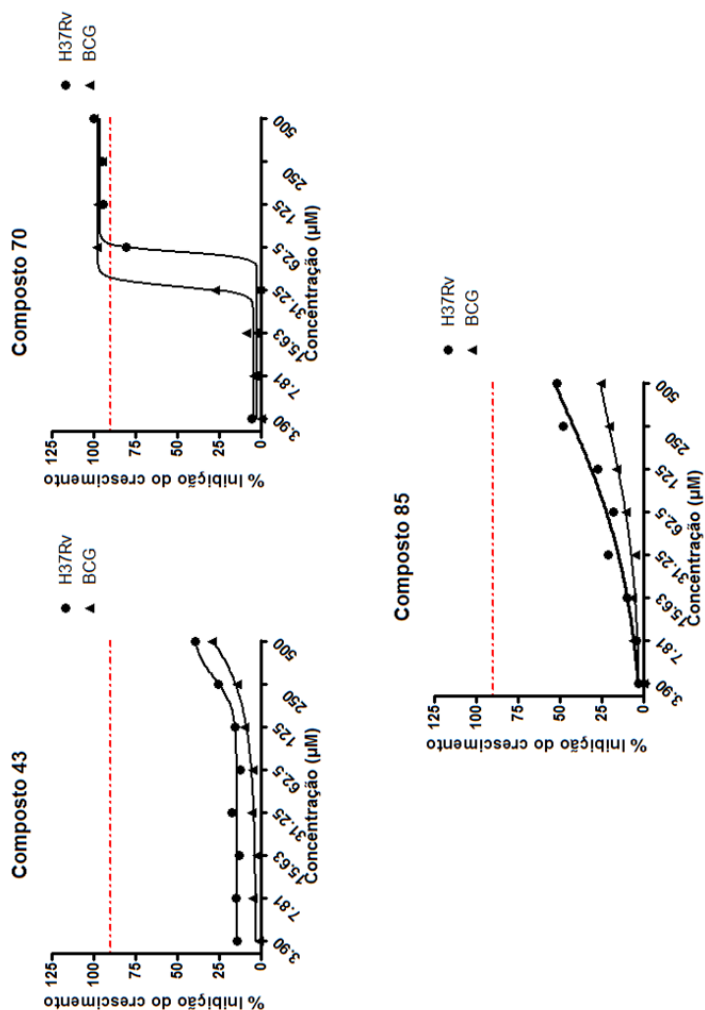
* Estes compostos não alcançaram 90% de inibição no crescimento das micobactérias.

Figura 22a. Gráficos obtidos nos ensaios de IC₉₀ com a cepa usada como vacina *Mycobacterium bovis* BCG e a cepa patogênica Mtb H37Rv. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpA de Mtb.



Cada gráfico representa uma curva dose-resposta de cada composto. O eixo y representa a porcentagem de inibição do crescimento e o eixo x representa a concentração na escala de micromolar. A linha pontilhada vermelha indica 90% de inibição do crescimento.

Figura 22b. Gráficos obtidos nos ensaios de IC_{90} com a cepa usada como vacina *Mycobacterium bovis* BCG e a cepa patogênica Mtb H37Rv. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpB de Mtb.



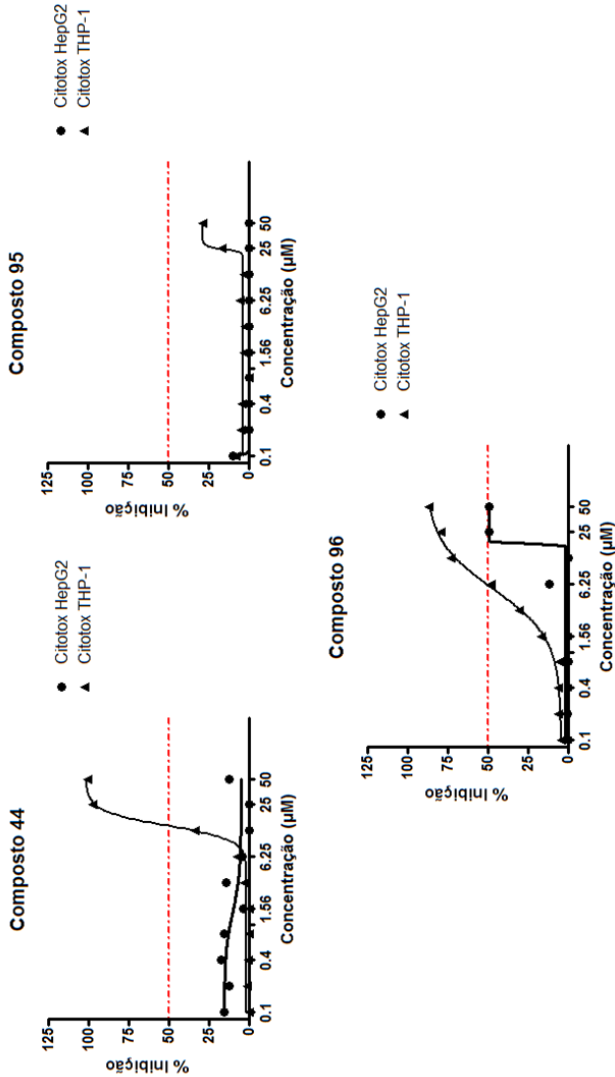
Cada gráfico representa uma curva dose-resposta de cada composto. O eixo y representa a porcentagem de inibição do crescimento e o eixo x representa a concentração na escala de micromolar. A linha pontilhada vermelha indica 90% de inibição do crescimento.

As fosfatases PtpA e PtpB supostamente tem um papel crucial no momento que o Mtb está dentro do macrófago humano. Segundo este pressuposto, esperava-se, portanto, que estes seis inibidores tivessem um baixo ou até mesmo nenhum efeito na sobrevivência da micobactéria em ensaios não infectivos. Apesar disso, dois dos seis compostos foram capazes de inibir 90% do crescimento de ambas as cepas utilizadas no ensaio. O composto 96 conseguiu inibir o crescimento em concentrações micromolares, 6,8 μM quando usada *M. bovis* BCG e 7,88 μM quando usada Mtb H37Rv. O composto 70 também foi capaz de inibir o crescimento de ambas as cepas, porém, somente em concentrações mais altas, 35,46 μM quando usado *M. bovis* BCG e 64,77 μM quando usada Mtb H37Rv. Assim, realizamos ensaios de citotoxicidade para avaliar se a inibição do crescimento das micobactérias causada pelos compostos 96 e 70 poderia ser explicada por um possível efeito citotóxico.

3.3.2 Avaliação da citotoxicidade das seis chalconas

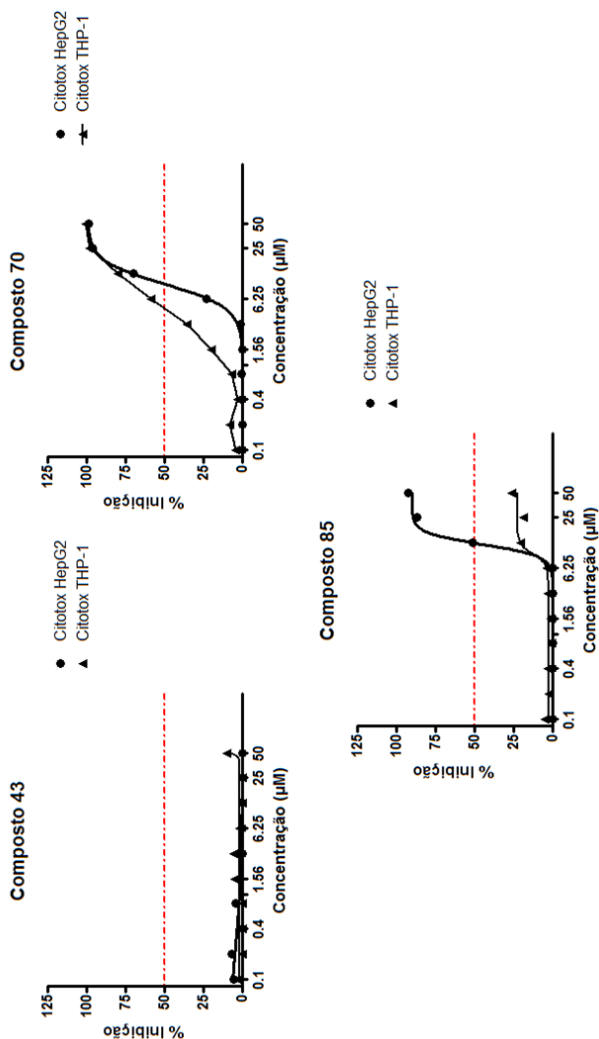
O Mtb replica dentro dos macrófagos alveolares humanos, portanto, um composto considerado um bom candidato a fármaco precisa apresentar duas importantes características: ao atravessar a membrana do macrófago o composto precisa ser capaz de atingir seu alvo molecular no Mtb, e também deve apresentar baixo efeito citotóxico na célula do hospedeiro. A citotoxicidade das seis chalconas foi avaliada em duas linhagens celulares humanas, HepG2 e THP-1As curvas dose-resposta obtidas para cada composto são apresentadas na Figura 23a e figura 23b e os valores de Tox_{50} são apresentados na Tabela 41.

Figura 23 a. Gráficos obtidos nos ensaios de citotoxicidade realizados com as linhagens de células humanas HepG2 e THP-1. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpA de Mtb.



Cada gráfico representa uma curva dose-resposta de cada composto. O eixo y representa a porcentagem de inibição do crescimento e o eixo x representa a concentração na escala de micromolar. A linha pontilhada vermelha indica 50% de inibição do crescimento celular.

Figura 23 b. Gráficos obtidos nos ensaios de citotoxicidade realizados com as linhagens de células humanas HepG2 e THP-1. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpB de Mtb.



Cada gráfico representa uma curva dose-resposta de cada composto. O eixo y representa a porcentagem de inibição do crescimento e o eixo x representa a concentração na escala de micromolar. A linha pontilhada vermelha indica 50% de inibição do crescimento celular.

Tabela 41. Valores de citotoxicidade de cada um dos seis compostos avaliados para as linhagens celulares HepG2 e THP-1.

Composto	Citotoxicidade (μM) HepG2	Citotoxicidade (μM) THP-1
43	*	*
44	*	14,21 \pm 0,12
70	12,23 \pm 2,82	4,87 \pm 0,14
85	12,47 \pm 0,37	*
95	*	*
96	*	6,12 \pm 0,02

* Estes compostos não alcançaram 50% de morte celular.

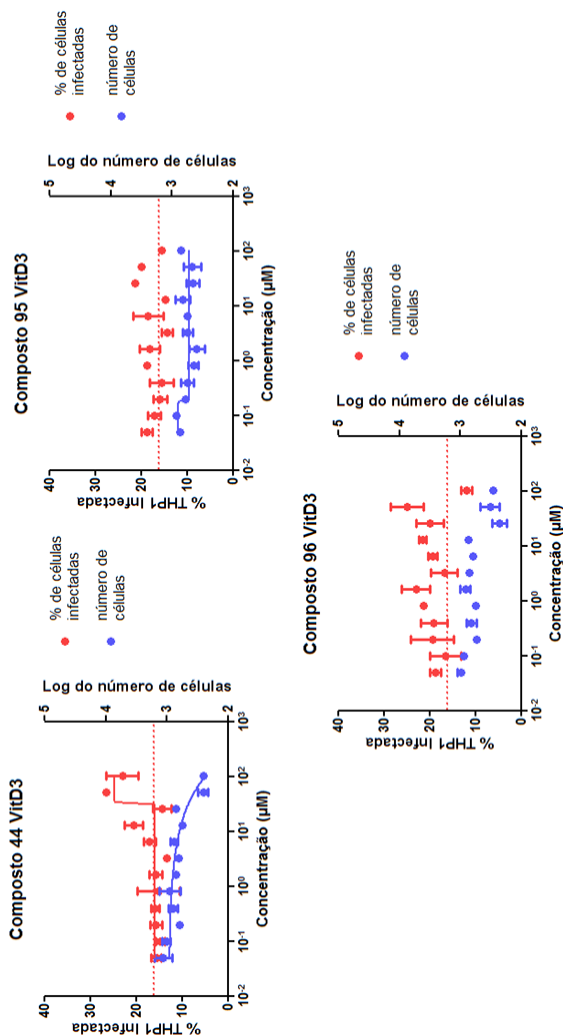
Como mostrado na tabela 41, duas chalconas (compostos 43 e 95) não alcançaram 50% de morte celular em ambas as linhagens celulares humanas. Podemos assumir então que ambos os compostos não são citotóxicos nas condições utilizadas no ensaio. Curiosamente, a única diferença entre os compostos 43 e 44 é a posição do grupamento nitro. Contudo, essa diferença parece ser muito importante quanto ao aspecto toxicológico na linhagem THP-1, já que o composto 43 é considerado não tóxico e o composto 44 é tóxico em concentrações em escala micromolar.

3.3.3 Avaliação da atividade intracelular das seis chalconas em ensaios de infecção

Uma vez estabelecidos os valores de IC_{90} e citotoxicidade de cada composto demos continuidade aos experimentos visando analisar o potencial destas chalconas em macrófagos ativados e infectados com BCG-GFP. Comparamos a atividade destes compostos em macrófagos diferenciados (com vitamina D_3) e macrófagos diferenciados e ativados (com vitamina D_3 e interferon-gama). Ao mesmo tempo, também analisamos um possível efeito citotóxico do composto sobre os macrófagos através da avaliação do número de células viáveis para cada concentração testada. Obtivemos os seguintes resultados:

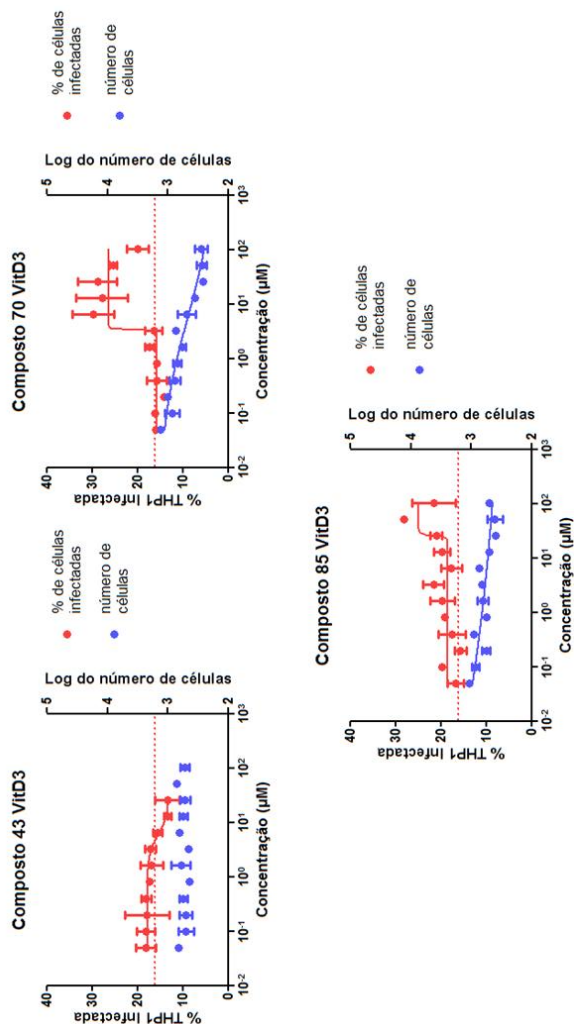
a) Macrófagos diferenciados com vitamina D_3 (Figura 24a e figura 24b): para os compostos 43, 85, 95 e 96 foi observada uma pequena variação do número de células e da porcentagem de células infectadas. Para os compostos 44 e 70, notamos um decréscimo do número de células proporcional ao aumento da concentração do composto. A porcentagem de células infectadas para ambos os compostos diminuiu nas maiores concentrações testadas; este efeito deve-se provavelmente a um efeito citotóxico que faz com que os macrófagos fiquem mais vulneráveis à infecção ou porque os compostos poderiam também provocar lise celular. Uma vez lisados os macrófagos, as bactérias presentes em seu interior podem sair e infectar outras células.

Figura 24a. Gráficos obtidos no ensaio de infecção da linhagem celular humana THP-1 com BCG-GFP. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpA de Mtb.



Cada gráfico representa uma curva dose-resposta de cada composto sobre os macrófagos diferenciados com vitamina D₃. O eixo y representa a porcentagem de células infectadas (pontos vermelhos) e o logaritmo do número de células (pontos azuis). O eixo x representa a concentração em escala micromolar. A linha pontilhada vermelha indica a porcentagem de células infectadas do controle positivo.

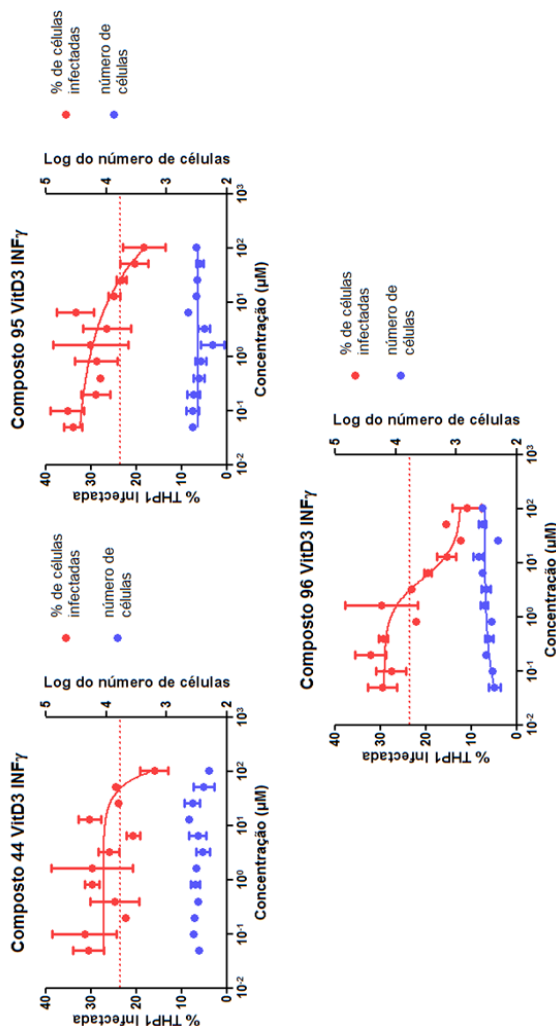
Figura 24b. Gráficos obtidos no ensaio de infecção da linhagem celular humana THP-1 com BCG-GFP. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpB de Mtb.



Cada gráfico representa uma curva dose-resposta de cada composto sobre os macrófagos diferenciados com vitamina D_3 . O eixo y representa a porcentagem de células infectadas (pontos vermelhos) e o logaritmo do número de células (pontos azuis). O eixo x representa a concentração em escala micromolar. A linha pontilhada vermelha indica a porcentagem de células infectadas do controle positivo.

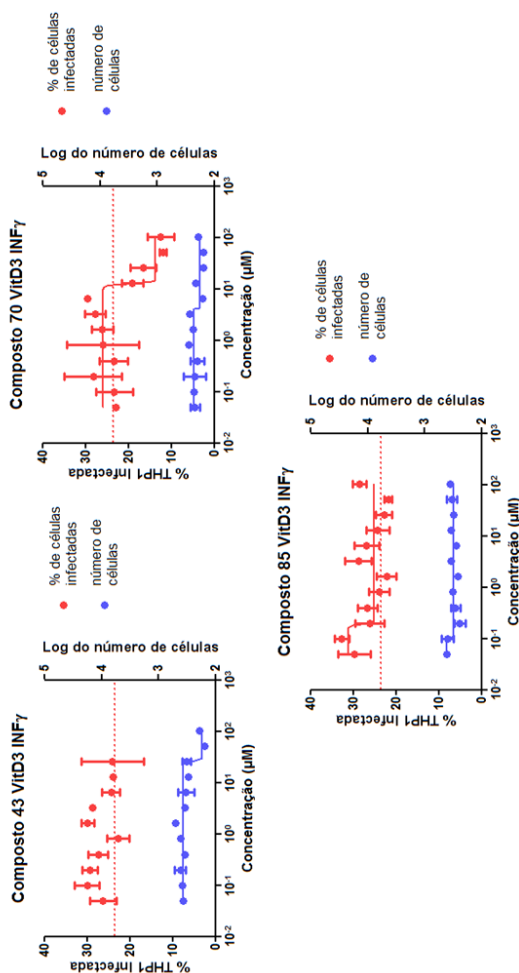
b) Macrófagos diferenciados com vitamina D₃ e ativados com interferon-gama (Figura 25a e 25b): para todos os compostos foi observada uma pequena variação no número de células. Aparentemente a ativação dos macrófagos reduz um possível efeito citotóxico causado pelo aumento de concentração dos compostos. Para os compostos 44, 70, 95 e 96 foi constatada uma atividade antitubercular, uma vez que o número de células infectadas decaiu proporcionalmente ao aumento da concentração do composto. Este comportamento não foi observado para os compostos 43 e 85.

Figura 25a. Gráficos obtidos no ensaio de infecção da linhagem celular humana THP-1 com BCG-GFP. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpA de Mtb.



Cada gráfico representa uma curva dose-resposta de cada composto sobre os macrófagos diferenciados com vitamina D₃ e ativados com interferon gama. O eixo y representa a porcentagem de células infectadas (pontos vermelhos) e o logaritmo do número de células (pontos azuis). O eixo x representa a concentração em escala micromolar. A linha pontilhada vermelha indica a porcentagem de células infectadas do controle positivo.

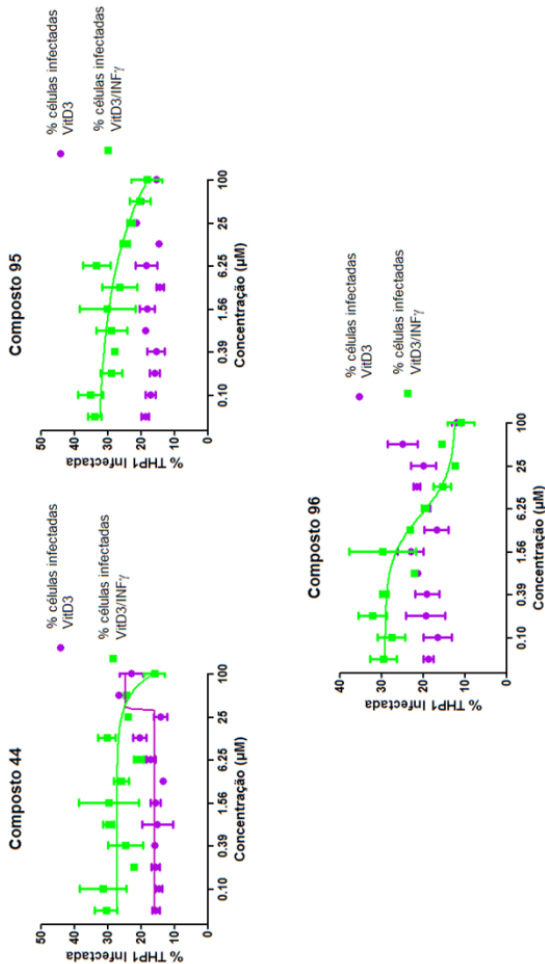
Figura 25b. Gráficos obtidos no ensaio de infecção da linhagem celular humana THP-1 com BCG-GFP. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpB de Mtb.



Cada gráfico representa uma curva dose-resposta de cada composto sobre os macrófagos diferenciados com vitamina D₃ e ativados com interferon gama. O eixo y representa a porcentagem de células infectadas (pontos vermelhos) e o logaritmo do número de células (pontos azuis). O eixo x representa a concentração em escala micromolar. A linha pontilhada vermelha indica a porcentagem de células infectadas do controle positivo.

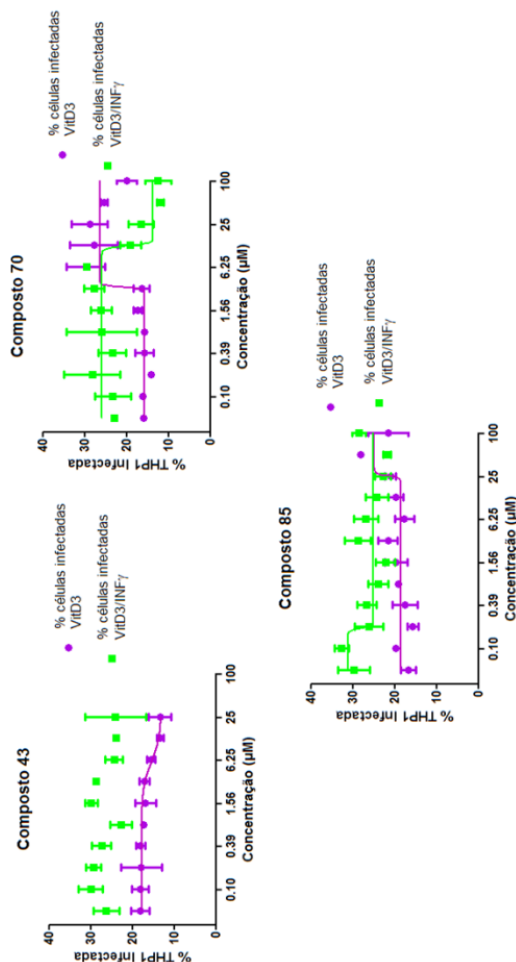
c) Comparação entre a porcentagem de células infectadas nos macrófagos diferenciados com vitamina D₃ e macrófagos diferenciados com vitamina D₃/ativados com interferon gama (Figura 26a e 26b): Devido ao fato das enzimas PtpA e PtpB desempenharem um importante papel ao interferir na transdução de sinal que leva a ativação do macrófago, assumimos que os inibidores destas fosfotirosina fosfatases poderiam provocar um decréscimo na porcentagem de células infectadas quando os macrófagos fossem diferenciados e ativados. Para os compostos 95 e 96, um decréscimo no número de células infectadas condizente com a curva dose resposta pode ser observado para os macrófagos diferenciados e ativados comparados com aqueles que não foram ativados. Para o composto 70 foi difícil realizar a comparação da porcentagem de células infectadas entre as duas condições testadas, devido a um possível efeito tóxico causado pelas altas concentrações do composto sobre os macrófagos somente diferenciados. Para os compostos 43, 44 e 85 não foram observadas diferenças significativas entre as duas condições testadas. Uma possível explicação seria de que estes compostos não foram capazes de alcançar seus alvos moleculares por não conseguirem transpor a barreira feita pela membrana do macrófago ou pela parede da bactéria.

Figura 26a. Comparação entre a porcentagem de células infectadas em macrófagos diferenciados com vitamina D₃ e macrófagos diferenciados com vitamina D₃/ ativados com interferon gama em testes de infecção. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpA de Mtb.



Cada gráfico representa uma curva dose-resposta para cada composto. O eixo y representa a porcentagem de células infectadas e o eixo x representa a concentração em escala micromolar. A linha roxa representa a porcentagem de macrófagos infectados diferenciados com vitamina D₃. A linha verde representa a porcentagem de macrófagos infectados diferenciados com vitamina D₃ e ativados com interferon gama.

Figura 26b. Comparação entre a porcentagem de células infectadas em macrófagos diferenciados com vitamina D₃ e macrófagos diferenciados com vitamina D₃/ativados com interferon gama em testes de infecção. Os três compostos apresentados nesta figura são inibidores competitivos da PtpB de Mtb.



Cada gráfico representa uma curva dose-resposta para cada composto. O eixo y representa a porcentagem de células infectadas e o eixo x representa a concentração em escala micromolar. A linha roxa representa a porcentagem de macrófagos infectados diferenciados com vitamina D₃. A linha verde representa a porcentagem de macrófagos infectados diferenciados com vitamina D₃ e ativados com interferon gama.

Usando como parâmetro a estrutura dos compostos 43 (por não ser citotóxico nas condições testadas para linhagens HepG2 e THP-1) e 96 (por apresentar atividade intracelular), realizou-se uma busca de análogos na biblioteca de compostos da GSK. A estrutura destes dois compostos foi usada como base, com o intuito de manter a baixa citotoxicidade e a atividade intracelular encontrada nos testes realizados. Selecionou-se 220 compostos análogos na biblioteca da GSK. Testes de citotoxicidade, MIC e intracelular com estes análogos foram realizados. No momento, buscamos estabelecer uma parceria entre a UFSC e a GSK para que os análogos não citotóxicos sejam enviados para a UFSC com o objetivo de verificar se estes possuem atividade inibitória da PtpA e da PtpB de Mtb.

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após um ano desenvolvendo atividades nos laboratórios da GSK em Tres Cantos, Espanha, técnicas envolvendo os modelos experimentais celulares para testar inibidores das fosfotirosina fosfatases PtpA e PtpB puderam ser aprendidas, a fim de futuramente poder implementá-las em nosso grupo de pesquisas no Brasil.

Utilizando essas técnicas analisou-se a citotoxicidade e a atividade antitubercular das seis chalconas publicadas em 2012 pelo nosso grupo de pesquisa (CHIARADIA et al., 2012). Esta análise levou à identificação de dois compostos que não são citotóxicos (compostos 43 e 95) e dois compostos que apresentaram atividade em ensaios de infecção intracelular (compostos 95 e 96).

Encontrar um inibidor destas enzimas que também apresenta uma boa atividade intracelular em testes de infecção, além da perspectiva no desenvolvimento de novos fármacos candidatos para o tratamento da doença, é de suma importância nos estudos químicos e biológicos para elucidar o papel da PtpA e PtpB na invasão do hospedeiro pelo patógeno.

3.5 PERSPECTIVAS

Dando continuidade ao trabalho feito em parceria com a GSK, esperamos realizar os ensaios enzimáticos com a PtpA e a PtpB utilizando os inibidores selecionados nos ensaios de citotoxicidade, MIC e intracelular pertencentes à biblioteca particular da empresa. Esperamos assim confirmar se a ação antitubercular destes compostos pode ser correlacionada com a atividade inibitória destas PTP.

Esperamos também avaliar os padrões estruturais destes análogos a fim de planejar novas chalconas com o intuito de buscar um inibidor mais potente e seletivo para as estas PTP.

REFERÊNCIAS

ÅKERMAN, L.; LUDVIGSSON, J.; CASAS, R. Low C-peptide levels and decreased expression of TNF and CD45 in children with high risk of type 1 diabetes. **Clinical Immunology**, v. 148, n. 1, p. 4-15, 2013.

ALONSO, A. et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 699-711, 2004.

ARBIBE, L. et al. An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF- κ B to alter transcription of host genes involved in immune responses. **Nature Immunology**, v. 8, n. 1, p. 47-56, 2007.

ARION, D. et al. Mutational analysis of tyr-501 of HIV-1 reverse transcriptase: Effects on ribonuclease H activity and inhibition of this activity by N-acylhydrazones. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 2, p. 1370-1374, 2002.

ASIF, M.; HUSAIN, A. Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antiplatelet Profile of Hydrazones Containing Synthetic Molecules. **Journal of Applied Chemistry**, v. 2013, p. 7, 2013.

AUSUBEL, F. M. et al. **Short Protocols in Molecular Biology**. 3rd. John Wiley & Sons, 1995.

ÁVILA, H. P. et al. Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 22, p. 9790-9794, 2008.

BACH, H. et al. Mycobacterium tuberculosis Virulence Is Mediated by PtpA Dephosphorylation of Human Vacuolar Protein Sorting 33B. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 5, p. 316-322, 2008.

BAHADUR, V. et al. ODependent efficacy of novel piperidine- And piperazine-based chalcones against the human parasite giardia intestinalis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 543-549, 2014.

BAHTA, M. et al. Utilization of nitrophenylphosphates and oxime-based ligation for the development of nanomolar affinity inhibitors of the Yersinia pestis outer protein H (YopH) phosphatase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2933-2943, 2011.

BARFORD, D.; JIA, Z.; TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases take off. **Nature Structural Biology**, v. 2, n. 12, p. 1043-1053, 1995.

BEDIA, K. K. et al. Synthesis and characterization of novel hydrazide-hydrazones and the study of their structure-antituberculosis activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1253-1261, 2006.

BEIERLEIN, J. M.; ANDERSON, A. C. New developments in vaccines, inhibitors of anthrax toxins, and antibiotic therapeutics for bacillus anthracis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 33, p. 5083-5094, 2011.

BENÍTEZ, J. et al. Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: New achievements. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 2, p. 303-312, 2011.

BERESFORD, N. et al. MptpB, a virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis*, exhibits triple-specificity phosphatase activity. **Biochemical Journal**, v. 406, n. 1, p. 13-18, 2007.

BERESFORD, N. J. et al. Inhibition of MptpB phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* impairs mycobacterial survival in macrophages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 5, p. 928-936, 2009.

BLACK, D. S.; BLISKA, J. B. Identification of p130(Cas) as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. **EMBO Journal**, v. 16, n. 10, p. 2730-2744, 1997.

BLACK, D. S. et al. The *Yersinia* tyrosine phosphatase YopH targets a novel adhesion-regulated signalling complex in macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 401-414, 2000.

BLACK, D. S. et al. Identification of an amino-terminal substrate-binding domain in the *Yersinia* tyrosine phosphatase that is required for efficient recognition of focal adhesion targets. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 1263-1274, 1998.

BLEVES, S.; CORNELIS, G. R. How to survive in the host: The *Yersinia* lesson. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 12, p. 1451-1460, 2000.

BLISKA, J. B. et al. The *Yersinia* tyrosine phosphatase: Specificity of a bacterial virulence determinant for phosphoproteins in the J774A.1 macrophage. **Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 6, p. 1625-1630, 1992.

BLISKA, J. B. et al. Modulation of innate immune responses by Yersinia type III secretion system translocators and effectors. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 1622-1631, 2013.

BLOOM, B. R.; MURRAY, C. J. L. Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. **Science**, v. 257, n. 5073, p. 1055-1064, 1992.

BOTTONE, E. J. Yersinia enterocolitica: Overview and epidemiologic correlates. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 4, p. 323-333, 1999.

BOULANGER, L. L. et al. Gentamicin and tetracyclines for the treatment of human plague: Review of 75 cases in New Mexico, 1985-1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 5, p. 663-669, 2004.

BOŽIĆ, D. D. et al. Antibacterial activity of three newly-synthesized chalcones & synergism with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Indian Journal of Medical Research**, v. 140, n. JUL, p. 130-137, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAITHWAITE, S. P. et al. Targeting phosphatases as the next generation of disease modifying therapeutics for Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 6, p. 899-906, 2012.

BRANDÃO, T. A. S. et al. Impaired acid catalysis by mutation of a protein loop hinge residue in a YopH mutant revealed by crystal structures. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 2, p. 778-786, 2009.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da peste**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 95 ISBN 978-85-334-1493-8.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. **Ministério da saúde**, v. 44, n. 2, 2014.

BRAUTIGAN, D. L. Protein Ser/ Thr phosphatases - The ugly ducklings of cell signalling. **FEBS Journal**, v. 280, n. 2, p. 324-345, 2013.

BURNETT, G.; KENNEDY, E. P. The enzymatic phosphorylation of proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 211, n. 2, p. 969-980, 1954.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Maps and Statistics. 2013. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/plague/maps/index.html> >. Acesso em: 16 novembro 2014.

CHANDA, D. et al. Anticancer activity, toxicity and pharmacokinetic profile of an indanone derivative. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 5, p. 988-995, 2012.

CHANDRA, K. et al. Design, synthesis and inhibition activity of novel cyclic peptides against protein tyrosine phosphatase A from

Mycobacterium tuberculosis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 23, p. 8365-8373, 2010.

CHARRIS, J. E. et al. Synthesis and antimalarial activity of (E) 2-(2'-chloro-3'-quinolinylmethylidene)-5,7-dimethoxyindanones. **Letters in Drug Design and Discovery**, v. 4, n. 1, p. 49-54, 2007.

CHEN, Y. T.; SETO, C. T. Divalent and trivalent α -ketocarboxylic acids as inhibitors of protein tyrosine phosphatases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 18, p. 3946-3952, 2002.

CHIARADIA, L. D. **Síntese, caracterização e estudo da relação estrutura-atividade (REA) de chalconas e de compostos heterocíclicos biologicamente ativos em doenças negligenciadas, hiperglicemia e leucemia**. 2010. (Tese de Doutorado). Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

CHIARADIA, L. D. et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 390-402, 2012.

CHIARADIA, L. D. et al. Synthetic chalcones as efficient inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 23, p. 6227-6230, 2008.

CIRRI, P. et al. The role of Cys12, Cys17 and Arg18 in the catalytic mechanism of low-M(r) cytosolic phosphotyrosine protein phosphatase. **European Journal of Biochemistry**, v. 214, n. 3, p. 647-657, 1993.

COHEN, P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation - A 25 year update. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 12, p. 596-601, 2000.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537-544, 1998.

CORNELIS, G. R.; WOLF-WATZ, H. The Yersinia Yop virulon: A bacterial system for subverting eukaryotic cells. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 5, p. 861-867, 1997.

DELEUIL, F. et al. Interaction between the Yersinia protein tyrosine phosphatase YopH and eukaryotic Cas/Fyb is an important virulence mechanism. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 53-64, 2003.

DEN HERTOOG, J. Regulation of protein phosphatases in disease and behaviour. Meeting on protein phosphatases. **EMBO Reports**, v. 4, n. 11, p. 1027-1032, 2003.

DEVKOTA, K. P. et al. Growth inhibition of human colon carcinoma cells by sesquiterpenoids and tetralones of *Zygogynum calothyrsum*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 4, p. 710-714, 2013.

ECCO, G. et al. Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase A (PtpA) activity is modulated by S-nitrosylation. **Chemical Communications**, v. 46, n. 40, p. 7501-7503, 2010.

ELCHEBLY, M. et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1544-1548, 1999.

FERNÁNDEZ, M. et al. A new series of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with phenanthroline-derived co-ligands: Selective *Trypanosoma cruzi* growth inhibitors. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 33, p. 11900-11911, 2013.

FERREIRA, C. V. et al. Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: Application to the rational design of small-molecule derivatives. **Biochimie**, v. 88, n. 12, p. 1859-1873, 2006.

FISCHER, E. H. Cellular regulation by protein phosphorylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, n. 2, p. 865-867, 2013.

FISCHER, E. H. et al. Structure of the site phosphorylated in the phosphorylase b to a reaction. **The Journal of biological chemistry**, v. 234, n. 7, p. 1698-1704, 1959.

FISCHER, E. H.; KREBS, E. G. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. **The Journal of biological chemistry**, v. 216, n. 1, p. 121-132, 1955.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity-a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980.

GLOBO, O. China declara quarentena em áreas de cidade após surto de peste bubônica. 2014. Disponível em: < <http://oglobo.globo.com/sociedade/saude/china-declara-quarentena-em-areas-de-cidade-apos-surto-de-pestes-bubonica-13340244> >. Acesso em: 16 de novembro de 2014.

GORDON, J. A. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. **Methods in Enzymology**, v. 201, p. 477-482, 1991.

GROSDENT, N. et al. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4165-4176, 2002.

GRUNDNER, C. et al. Structural Basis for Selective Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase PtpB. **Structure**, v. 15, n. 4, p. 499-509, 2007.

GUAN, K.; DIXON, J. E. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. **Science**, v. 249, n. 4968, p. 553-556, 1990.

HACKAM, D. J. et al. Regulation of phagosomal acidification. Differential targeting of Na⁺/H⁺ exchangers, Na⁺/K⁺-ATPases, and vacuolar-type H⁺-ATPases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 47, p. 29810-29820, 1997.

HAMID, N. et al. YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. **Microbial Pathogenesis**, v. 27, n. 4, p. 231-242, 1999.

HASSAN, S. Y. Synthesis, antibacterial and antifungal activity of some new pyrazoline and pyrazole derivatives. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2683-2711, 2013.

HAYAT, F. et al. Antiprotozoal activity of chloroquinoline based chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1897-1905, 2011.

HOGAN, M. et al. Biomolecular Interactions of Small-molecule Inhibitors Affecting the YopH Protein Tyrosine Phosphatase. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 81, n. 3, p. 323-333, 2013.

HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, R. Protein tyrosine phosphatases: Counting the trees in the forest. **Gene**, v. 225, n. 1-2, p. 1-8, 1998.

HU, X.; VUJANAC, M.; EREC STEBBINS, C. Computational analysis of tyrosine phosphatase inhibitor selectivity for the virulence factors YopH and SptP. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 23, n. 2, p. 175-187, 2004.

HU, X. et al. Inhibitors of the Yersinia protein tyrosine phosphatase through high throughput and virtual screening approaches. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 4, p. 1056-1062, 2013.

HUANG, X. et al. Asperterpenoid A, a new sesterterpenoid as an inhibitor of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B from the culture of Aspergillus sp. 16-5c. **Organic Letters**, v. 15, n. 4, p. 721-723, 2013.

HUANG, Z. et al. Derivatives of salicylic acid as inhibitors of YopH in *Yersinia pestis*. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 76, n. 2, p. 85-99, 2010.

HUMPHREYS, D.; HUME, P. J.; KORONAKIS, V. The *Salmonella* Effector SptP Dephosphorylates Host AAA+ ATPase VCP to Promote Development of its Intracellular Replicative Niche. **Cell Host and Microbe**, v. 5, n. 3, p. 225-233, 2009.

HUNTER, T. Signaling - 2000 and beyond. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 113-127, 2000.

HUSAIN, A. et al. Bis-chalcones and flavones: Synthesis and antimicrobial activity. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 70, n. 3, p. 443-449, 2013.

IMAN, M.; DAVOOD, A.; BANAROUËI, N. QSAR study of chalcone derivatives as anti-Leishmania agents. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 38, n. 5, p. 716-724, 2014.

ITO, M. et al. Pharmacological effects of jtt-551, a novel protein tyrosine phosphatase 1b inhibitor, in diet-induced obesity mice. **Journal of Diabetes Research**, v. 2014, 2014.

JOHNSON, L. N. **Cell signalling through covalent modification and allostery**. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. CARRONDO, M. A. e SPADON, P.: 87-92 p. 2012.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.

JONNALAGADDA, V. G. et al. The prelude on novel receptor and ligand targets involved in the treatment of diabetes mellitus. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. 3, p. 209-217, 2014.

KE, S. et al. Investigation of catalytic loop structure, dynamics, and function relationship of Yersinia protein tyrosine phosphatase by temperature-jump relaxation spectroscopy and X-ray structural determination. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 21, p. 6166-6176, 2012.

KE, Y.; CHEN, Z.; YANG, R. Yersinia pestis: Mechanisms of entry into and resistance to the host cell. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. DEC, 2013.

KEANE, J.; REMOLD, H. G.; KORNFELD, H. Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 4, p. 2016-2020, 2000.

KHANDELWAL, P. et al. Solution structure and phosphopeptide binding to the N-terminal domain of Yersinia YopH: Comparison with a crystal structure. **Biochemistry**, v. 41, n. 38, p. 11425-11437, 2002.

KIM, S. E. et al. Isothiazolidinone (IZD) as a phosphoryl mimetic in inhibitors of the Yersinia pestis protein tyrosine phosphatase YopH. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 7, p. 639-645, 2011.

KLAMAN, L. D. et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine

phosphatase 1B-deficient mice. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 15, p. 5479-5489, 2000.

KOIRALA, J. Plague: Disease, Management, and Recognition of Act of Terrorism. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 2, p. 273-287, 2006.

KOLMODIN, K.; ÅQVIST, J. The catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatases revisited. **FEBS Letters**, v. 498, n. 2-3, p. 208-213, 2001.

KOUL, A. et al. Cloning and characterization of secretory tyrosine phosphatases of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 19, p. 5425-5432, 2000.

KREBS, E. G.; FISCHER, E. H. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. **BBA - General Subjects**, v. 20, n. C, p. 150-157, 1956.

LAWN, S. D.; ZUMLA, A. I. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 57-72, 2011.

LEE, K. et al. Tripeptide inhibitors of Yersinia protein-tyrosine phosphatase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 15, p. 2577-2581, 2003.

LIANG, F. et al. Aurintricarboxylic Acid Blocks in Vitro and in Vivo Activity of YopH, an Essential Virulent Factor of Yersinia pestis, the Agent of Plague. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 43, p. 41734-41741, 2003.

LIN, Y. M. et al. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 2795-2802, 2002.

LINN, T. C. et al. Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. XI. Comparative studies of regulatory properties of the pyruvate dehydrogenase complexes from kidney, heart, and liver mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 64, n. 1, p. 227-234, 1969.

LIU, M. et al. Structure-activity relationships of antileishmanial and antimalarial chalcones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 13, p. 2729-2738, 2003.

LOGSDON, L. K.; MECSAS, J. Requirement of the *Yersinia pseudotuberculosis* effectors YopH and YopE in colonization and persistence in intestinal and lymph tissues. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4595-4607, 2003.

MADHURANTAKAM, C.; CHAVALI, V. R. M.; DAS, A. K. Analyzing the catalytic mechanism of MPTpA: A low molecular weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* through site-directed mutagenesis. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 71, n. 2, p. 706-714, 2008.

MANGER, M. et al. Discovery of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase A (MPTpA) inhibitors based on natural products and a fragment-based approach. **ChemBioChem**, v. 6, n. 10, p. 1749-1753, 2005.

MANNING, G. et al. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 10, p. 514-520, 2002.

MARTINS, P. G. A. **Caracterização de uma arsenato redutase de *Trypanosoma cruzi* e inibição de um fosfotirosina fosfatase de *Yersinia enterocolitica* por chalconas sintéticas**. 2010. (Dissertação de mestrado). Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

MARTINS, P. G. A. et al. Synthetic chalcones and sulfonamides as new classes of *Yersinia enterocolitica* YopH tyrosine phosphatase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 35-41, 2013.

MASCARELLO, A. et al. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: Kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 3783-3789, 2010.

MASCARELLO, A. et al. Discovery of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase B (PtpB) Inhibitors from Natural Products. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.

MATSUMOTO, H.; YOUNG, G. M. Translocated effectors of *Yersinia*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 94-100, 2009.

MCCONNELL, J. L.; WADZINSKI, B. E. Targeting protein serine/threonine phosphatases for drug development. **Molecular Pharmacology**, v. 75, n. 6, p. 1249-1261, 2009.

MCGANN, M. FRED pose prediction and virtual screening accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 3, p. 578-596, 2011.

MENEGATTI, A. C. O. **Estudos de inibição de proteínas tirosina fosfatases de *Mycobacterium tuberculosis* e *Yersinia enterocolitica*, e caracterização de uma proteína serina/treonina fosfatase de *Mycoplasma synoviae***. 2014. (Tese de doutorado). Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

MORE, U. A. et al. Design, synthesis, molecular docking and 3D-QSAR studies of potent inhibitors of enoyl-acyl carrier protein reductase as potential antimycobacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 71, p. 199-218, 2014.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, Dec 30 2009.

MORRIS, G. M. et al. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

MÜLLER, D. et al. Brunsvicamides A-C: Sponge-related cyanobacterial peptides with *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase inhibitory activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 16, p. 4871-4878, 2006.

NAGAR, B. et al. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). **Cancer Research**, v. 62, n. 15, p. 4236-4243, 2002.

NAGARAPU, L. et al. Studies on the synthetic and structural aspects of benzosuberones bearing 2, 4-thiazolidenone moiety as potential anti-cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 71, p. 91-97, 2014.

NAVIS, A. C. et al. Protein tyrosine phosphatases in glioma biology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 2, p. 157-175, 2010.

OLIVEIRA, K. N. et al. Sulfonyl-hydrazones of cyclic imides derivatives as potent inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B (PtpB). **MedChemComm**, v. 2, n. 6, p. 500-504, 2011.

OLSEN, J. V. et al. Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. **Cell**, v. 127, n. 3, p. 635-648, 2006.

OpenEye OEDocking 2013. OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>.

PAPPANO, N. B.; PUIG DE CENTORBI, O.; DEBATTISTA, N. B. Kinetics of the bacteriostatic action of synthetic and natural chalcones on a Staphylococcus aureus strain. **CINETICA DE LA ACCION BACTERIOSTATICA DE CHALCONAS NATURALES Y DE SINTESIS SOBRE UNA CEPA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS**, v. 17, n. 1, p. 27-32, 1985.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. Quarta edição. Estados Unidos: Oxford University Press, 2009. pág. 424-429

PERRY, R. D.; FETHERSTON, J. D. *Yersinia pestis* - Etiologic agent of plague. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 1, p. 35-66, 1997.

PERSSON, C. et al. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130(Cas) and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. **EMBO Journal**, v. 16, n. 9, p. 2307-2318, 1997.

PHAN, J. et al. High-Resolution Structure of the *Yersinia pestis* Protein Tyrosine Phosphatase YopH in Complex with a Phosphotyrosyl Mimetic-Containing Hexapeptide. **Biochemistry**, v. 42, n. 45, p. 13113-13121, 2003.

PIETERS, J. *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 6, p. 399-407, 2008.

POIRIER, V.; BACH, H.; AV-GAY, Y. *Mycobacterium tuberculosis* promotes anti-apoptotic activity of the macrophage by PtpA protein-dependent dephosphorylation of host GSK3 α . **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, 2014.

POSNER, B. I. et al. Peroxovanadium compounds. A new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 6, p. 4596-4604, 1994.

POWELL, M. J. D. Restart procedures for the conjugate gradient method. **Mathematical Programming**, v. 12, n. 1, p. 241-254, 1977.

PUTZKER, M.; SAUER, H.; SOBE, D. Plague and other human infections caused by *Yersinia* species. **Clinical Laboratory**, v. 47, n. 9-10, p. 453-466, 2001.

RAUGEI, G.; RAMPONI, G.; CHIARUGI, P. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: Small, but smart. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 6, p. 941-949, 2002.

RAWLS, K. A. et al. Fragment-based discovery of selective inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 24, p. 6851-6854, 2009.

ROLÁN, H. G.; DURAND, E. A.; MECSAS, J. Identifying *Yersinia* yopH-targeted signal transduction pathways that impair neutrophil responses during in vivo murine infection. **Cell Host and Microbe**, v. 14, n. 3, p. 306-317, 2013.

ROSEMBERG, J. Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 7, n. 2, 1999.

RUSSELL, D. G.; BARRY III, C. E.; FLYNN, J. L. Tuberculosis: What we don't know can, and does, hurt us. **Science**, v. 328, n. 5980, p. 852-856, 2010.

SAUVONNET, N. et al. YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 805-815, 2002.

SCIOR, T. et al. Are vanadium compounds drugable? Structures and effects of antidiabetic vanadium compounds: A critical review. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 11, p. 995-1008, 2005.

SEIBERT, S. F. et al. Polyketides from the marine-derived fungus *Ascochyta salicorniae* and their potential to inhibit protein phosphatases. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 4, n. 11, p. 2233-2240, 2006.

SILVA, A. P.; TABERNERO, L. New strategies in fighting TB: Targeting *Mycobacterium tuberculosis*- secreted phosphatases MptpA & MptpB. **Future Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 8, p. 1325-1337, 2010.

SINGH, R. et al. Disruption of mptpB impairs the ability of *Mycobacterium tuberculosis* to survive in guinea pigs. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 751-762, 2003.

SIVAKUMAR, P. M. et al. Novel chalcones and 1,3,5-triphenyl-2-pyrazoline derivatives as antibacterial agents. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 76, n. 5, p. 407-411, 2010.

SIVAKUMAR, P. M.; MUTHU KUMAR, T.; DOBLE, M. Antifungal activity, mechanism and QSAR studies on chalcones. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 74, n. 1, p. 68-79, 2009.

SMEGO, R. A.; FREAN, J.; KOORNHOF, H. J. Yersiniosis I: Microbiological and clinicoepidemiological aspects of plague and non-plague *Yersinia* infections. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1-15, 1999.

SMILEY, S. T. Immune defense against pneumonic plague. **Immunological Reviews**, v. 225, n. 1, p. 256-271, 2008.

SOELLNER, M. B. et al. Fragment-based substrate activity screening method for the identification of potent inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis phosphatase PtpB. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 31, p. 9613-9615, 2007.

STÜLKE, J. More than just activity control: Phosphorylation may control all aspects of a protein's properties. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 273-275, 2010.

SUN, J. P. et al. Crystal structure of the Yersinia protein-tyrosine phosphatase YopH complexed with a specific small molecule inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 35, p. 33392-33399, 2003.

SWARUP, G.; COHEN, S.; GARBERS, D. L. Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 107, n. 3, p. 1104-1109, 1982.

TARTAGLIA, M. et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **Nature Genetics**, v. 34, n. 2, p. 148-150, 2003.

TAUTZ, L. et al. Inhibition of Yersinia tyrosine phosphatase by furanyl salicylate compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 10, p. 9400-9408, 2005.

THOMPSON, K. H. et al. Vanadium treatment of type 2 diabetes: A view to the future. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 4, p. 554-558, 2009.

TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases: From genes, to function, to disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 833-846, 2006.

TONKS, N. K. Protein Tyrosine Phosphatases: From Housekeeping Enzymes to Master-Regulators of Signal Transduction. **The FEBS journal**, v. 280, n. 2, p. 346-378, 2013.

TONY, Y. et al. Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, YopH. **Journal of Experimental Medicine**, v. 190, n. 9, p. 1343-1350, 1999.

TÖRÖK, B. et al. Diaryl hydrazones as multifunctional inhibitors of amyloid self-assembly. **Biochemistry**, v. 52, n. 7, p. 1137-1148, 2013.

TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. **Microbiologia**. ed. 4. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p. 329-335

TRÜLZSCH, K. et al. Contribution of the major secreted Yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5227-5234, 2004.

UBERSAX, J. A.; FERRELL JR, J. E. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 530-541, 2007.

VAN BOOGAARD, J. D. et al. New drugs against tuberculosis: Problems, progress, and evaluation of agents in clinical development. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 849-862, 2009.

VERDONK, M. L. et al. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, n. 4, p. 609-23, Sep 1 2003.

VERGNE, I. et al. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 11, p. 4033-4038, 2005.

VIBOUD, G. I.; BLISKA, J. B. *Yersinia* Outer Proteins: Role in Modulation of Host Cell Signaling Responses and Pathogenesis. **Annual Review of microbiology**, v. 59 p. 69-89, 2005.

VINTONYAK, V. V. et al. The therapeutic potential of phosphatase inhibitors. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, n. 3, p. 272-283, 2009.

VINTONYAK, V. V.; WALDMANN, H.; RAUH, D. Using small molecules to target protein phosphatases. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 2145-2155, 2011.

VOVK, A. I. et al. Inhibition of *Yersinia* protein tyrosine phosphatase by phosphonate derivatives of calixarenes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 2, p. 483-487, 2010.

VYAS, D. H. et al. Synthesis, antitubercular and antimicrobial activities of some new pyrazoline and isoxazole derivatives. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 84, n. 11, p. 1140-1144, 2007.

WESTERMARK, L.; FAHLGREN, A.; FÄLLMAN, M. Yersinia pseudotuberculosis efficiently escapes polymorphonuclear neutrophils during early infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1181-1191, 2014.

WHITTIER, S. K.; LORIA, J. P. ^1H , ^{15}N , and ^{13}C backbone resonance assignments for the yersinia protein tyrosine phosphatase YopH. **Biomolecular NMR Assignments**, p. 1-3, 2013.

WHO. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2014. **WHO report 2014**, v. WHO/HTM/TB/2014.08, 2014.

WON, S. J. et al. Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 103-112, 2005.

WONG, D. et al. Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar- H^{+} -ATPase to inhibit phagosome acidification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 48, p. 19371-19376, 2011.

WONG, D.; CHAO, J. D.; AV-GAY, Y. Mycobacterium tuberculosis-secreted phosphatases: From pathogenesis to targets for TB drug development. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 100-109, 2013.

WREN, B. W. The yersinia--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. **Nature reviews. Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 55-64, 2003.

YIN, S. et al. Pseudoceramines A-D, new antibacterial bromotyrosine alkaloids from the marine sponge *Pseudoceratina* sp. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 19, p. 6755-6760, 2011.

ZENG, L. F. et al. A Facile Hydroxyindole Carboxylic Acid Based Focused Library Approach for Potent and Selective Inhibitors of Mycobacterium Protein Tyrosine PhosphataseB. **ChemMedChem**, v. 8, n. 6, p. 904-908, 2013.

ZHANG, Z. Y. Protein Tyrosine Phosphatases: Structure and Function, Substrate Specificity, and Inhibitor Development. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 42, p. 209-234, 2002.

ZHANG, Z. Y. et al. Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant *Yersinia* protein tyrosine phosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 33, p. 23759-23766, 1992.

ZHONG, L. et al. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by *Trypanosoma cruzi* is linked to cell invasion. **FEMS Microbiology Letters**, v. 161, n. 1, p. 15-20, 1998.

ZHOU, B. et al. Targeting mycobacterium protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 10, p. 4573-4578, 2010.

ZHU, J. W. et al. Structurally Distinct Phosphatases CD45 and CD148 Both Regulate B Cell and Macrophage Immunoreceptor Signaling. **Immunity**, v. 28, n. 2, p. 183-196, 2008.

ZHU, Y. et al. CD45 deficiency drives amyloid- β peptide oligomers and neuronal loss in alzheimer's disease mice. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 4, p. 1355-1365, 2011.

ZWERLING, A. et al. The BCG world atlas: A database of global BCG vaccination policies and practices. **PLoS Medicine**, v. 8, n. 3, 2011.

APÊNDICE A

Martins, P.G.A.; Menegatti, A.C.O.; Chiaradia-Delatorre, L.D.; Oliveira, K. N.; Guido, R.V.C.; Andricopulo, A.D.; Vernal, J.; Yunes, R.A.; Nunes, R.J.; Terenzi, H. Synthetic chalcones and sulfonamides as new classes of *Yersinia enterocolitica* YopH tyrosine phosphatase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 0, p. 35-41, 2013.

doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.04.018

European Journal of Medicinal Chemistry 64 (2013) 35–41



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Short communication

Synthetic chalcones and sulfonamides as new classes of *Yersinia enterocolitica* YopH tyrosine phosphatase inhibitors



Priscila Graziela Alves Martins^{a,1}, Angela Camila Orbem Menegatti^{a,1}, Louise Domeneghini Chiaradia-Delatorre^{a,b}, Kely Navakoski de Oliveira^b, Rafael Victorio Carvalho Guido^c, Adriano Defini Andricopulo^c, Javier Vernal^a, Rosendo Augusto Yunes^b, Ricardo José Nunes^{b,*,*}, Hernán Terenzi^{a,*}

^a Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b Laboratório Estrutura e Atividade (LEAT), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^c Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC), Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense 400, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 March 2013

Received in revised form

7 April 2013

Accepted 9 April 2013

Available online 16 April 2013

Keywords:

Enzyme inhibition
Tyrosine phosphatase
YopH
Synthetic compounds

ABSTRACT

YopH plays a relevant role in three pathogenic species of *Yersinia*. Due to its importance in the prevention of the inflammatory response of the host, this enzyme has become a valid target for the identification and development of new inhibitors. In this work, an in-house library of 283 synthetic compounds was assayed against recombinant YopH from *Yersinia enterocolitica*. From these, four chalcone derivatives and one sulfonamide were identified for the first time as competitive inhibitors of YopH with binding affinity in the low micromolar range. Molecular modeling investigations indicated that the new inhibitors showed similar binding modes, establishing polar and hydrophobic contacts with key residues of the YopH binding site.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

APÊNDICE B

Chiaradia-Delatorre, L.D.; Martins, P.G.A.; Cordeiro, M. S.; Guido, R.V.C.; Ecco, G.; Andricopulo, A.D.; Yunes, R.A.; Vernal, J.; Nunes, R.J.; Terenzi, H. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 390-402, 2012.

doi: 10.1021/jm2012062. Epub 2011 Dec 20.

Journal of
**Medicinal
Chemistry**

Article

pubs.acs.org/jmc

Synthesis, Biological Evaluation, And Molecular Modeling of Chalcone Derivatives As Potent Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatases (PtpA and PtpB)

Louise Domeneghini Chiaradia,^{†,‡} Priscila Graziela Alves Martins,[†] Marlon Norberto Sechini Cordeiro,[‡] Rafael Victorio Carvalho Guido,[§] Gabriela Ecco,[†] Adriano Defini Andricopulo,[§] Rosendo Augusto Yunes,[‡] Javier Vernal,[†] Ricardo José Nunes,^{*,‡} and Hernán Terenzi^{*,†}

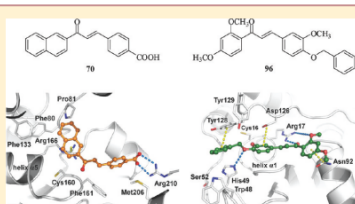
[†]Centro de Biologia Molecular Estrutural, CEBIME–UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, 88040–900 Florianópolis–SC, Brasil

[‡]Laboratório Estrutura e Atividade, Departamento de Química, LEAT–CFM–UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, 88040–900 Florianópolis–SC, Brasil

[§]Laboratório de Química Medicinal e Computacional, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-Carlense 400, 13560–970 São Carlos–SP, Brasil.

Supporting Information

ABSTRACT: Tuberculosis (TB) is a major infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). According to the World Health Organization (WHO), about 1.8 million people die from TB and 10 million new cases are recorded each year. Recently, a new series of naphthylchalcones has been identified as inhibitors of Mtb protein tyrosine phosphatases (PTPs). In this work, 100 chalcones were designed, synthesized, and investigated for their inhibitory properties against MtbPTps. Structure–activity relationships (SAR) were developed, leading to the discovery of new potent inhibitors with IC₅₀ values in the low-micromolar range. Kinetic studies revealed competitive inhibition and high selectivity toward the Mtb enzymes. Molecular modeling investigations were carried out with the aim of revealing the most relevant structural requirements underlying the binding affinity and selectivity of this series of inhibitors as potential anti-TB drugs.



APÊNDICE C

**EXPLORING THE PHOSPHOTYROSINE PHOSPHATASES
PTPA AND PTPB FROM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
AS TARGETS FOR NOVEL DRUGS TO COMBAT
TUBERCULOSIS**

Priscila G. Alves Martins^{1,2}, Ruben Gonzalez del Rio², Pedro A. Torres-Gomez², Eva M. Lopez-Roman², Louise D. Chiaradia-Delatorre¹, Maria Esther Perez-Herran², Alfonso Mendoza-Losana², Hernán Terenzi¹

¹ *Centro de Biologia Estrutural Molecular (CEBIME) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Florianópolis, Santa Catarina, Brazil*

² *GlaxoSmithKline - Diseases of the Developing World (DDW)- Tuberculosis-Tres Cantos, Madrid, Spain*

Tuberculosis (TB) is an airborne infection disease that affects mainly the lungs, it is caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). There were 9 million new cases and 1.4 million estimated TB deaths in 2011 (WHO, 2012). During the infection Mtb secretes two proteins tyrosine phosphatases (PTP), PtpA and PtpB, which are reported to be fundamental to its pathogenicity (BACH et al., 2008; ZHOU et al., 2010). Due to the marked importance of both PTPs for the survival of Mtb within the macrophage, these two proteins appear as promising targets of new drugs against TB. Recently, six new potent inhibitors demonstrated to have competitive inhibition and low-micromolar range IC₅₀ activity against these Mtb enzymes *in vitro* (CHIARADIA et al., 2011). The evaluation of activity and toxicity of those inhibitors in *in vitro* assays is the main objective of this work. To investigate the toxicity a serial dilution of the compounds (ranging from 0.1 to 50 micromolar) was assayed in HepG2 and THP1 cell cultures. The minimum inhibitory concentrations (MICs) for the six compounds were also measured in *Mycobacterium bovis* BCG and Mtb H37Rv using concentrations ranging from 0.23 to 500 micromolar. The evaluation of activity and toxicity of the PtpA and PtpB inhibitors showed that two compounds out of the six (43 and 95) presented reasonable therapeutic window, and one (96) showed low micromolar antitubercular activity (MIC

values: 6.8 μM towards *Mycobacterium bovis* BCG and 7.8 μM towards Mtb H37Rv). Further analyses to address their activity in activated macrophages infected with *Mycobacterium bovis* BCG are in progress.

Global Tuberculosis Report 2012, World Health Organization. Available in http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf (accessed April 28 2013).

Bach, H.; Papavinasasundaram, K. G.; Wong, D.; Hmama, Z.; Av-Gay, Y. *Mycobacterium tuberculosis* Virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. *Cell Host Microbe* 2008, 3 (5), 316-322)

Zhou, B.; He, Y.; Zhang, X.; Xu, J.; Luo, Y.; Wang, Y.; Franzblau, S. G.; Yang, Z.; Chan, R. J.; Liu, Y.; Zheng, J.; Zhang, Z. Y. Targeting mycobacterium protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010, 107 (10), 4573-4578.

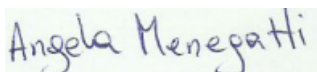
Chiaradia, L. D.; Alves Martins, P. G.; Cordeiro, M. N. S.; Guido, R. V. C.; Ecco, G.; Andricopulo, A. D.; Yunes, R. A.; Vernal, J.; Nunes, R. J.; Terenzi, H. Synthesis, biological evaluation, and molecular modelling of chalcone derivatives as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB). *Journal of Medicinal Chemistry*. 2011,55, 390-402.

Declaração

Declaro para os devidos fins, a pedido da parte interessada, que Priscila Graziela Alves Martins, aluna de doutorado pelo programa de pós-graduação em Bioquímica, utilizou com o meu consentimento alguns resultados de triagem, IC_{50} e de K_i obtidos para as enzimas PtpA, PtpB e PTP1B cujos experimentos foram realizados por minha pessoa. Estes dados são apresentados na tese de doutorado de Priscila e devidamente referenciados.

Entendo que o uso destas informações foi feito com o intuito de comparar com os resultados obtidos para a enzima YopH, tema de doutorado trabalhado pela parte interessada.

Por ser verdade, firmo o presente.

A handwritten signature in blue ink that reads "Angela Menegatti". The signature is written in a cursive, slightly slanted style. The letters are connected, and the ink is a medium blue color.

Angela Camila Orbem Menegatti

